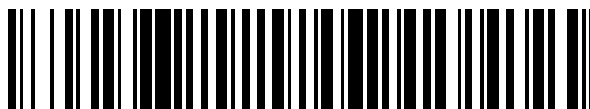


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 193**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
A61K 35/26 (2006.01)
A61K 35/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2003 E 03761997 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1539929**

54 Título: **Métodos para restaurar el repertorio inmune en pacientes con defectos inmunológicos relacionados con la autoinmunidad y trasplante de órganos o de células madre hematopoyéticas**

30 Prioridad:

28.06.2002 US 393042 P
04.12.2002 US 431212 P
22.01.2003 US 442001 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.09.2013

73 Titular/es:

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)
5791 VAN ALLEN WAY
CARLSBAD, CA 92008, US

72 Inventor/es:

BERENSON, RONALD;
BONYHADI, MARK y
KALAMASZ, DALE

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 422 193 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

Métodos para restaurar el repertorio inmune en pacientes con defectos inmunológicos relacionados con la autoinmunidad y trasplante de órganos o de células madre hematopoyéticas

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere generalmente a métodos para eliminar las subpoblaciones indeseadas de células T (por ejemplo, autorreactivas, alorreactivas, patógenas) de una población mixta de células T.

Descripción de la técnica relacionada

- 15 La capacidad de las células T para reconocer el universo de antígenos asociados con diversos tipos de cáncer u organismos infecciosos se confiere por su receptor de antígenos de células T (TCR), que se compone tanto de una cadena α (alfa) y una β (beta) o una cadena γ (gamma) y una δ (delta). Las proteínas que componen estas cadenas están codificadas por el ADN, que emplea un mecanismo único para la generación de la enorme diversidad de TCR. Este receptor multisubunitario de reconocimiento inmune se asocia con el complejo CD3 y se une a péptidos presentados por las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). La unión del TCR al péptido antigénico en la APC es el evento central en la activación de células T, que se produce en una sinapsis inmunológica en el punto de contacto entre la célula T y la APC.

- 25 Para mantener la activación de las células T, los linfocitos T típicamente requieren una segunda señal co-estimuladora. La coestimulación es típicamente necesaria para que una célula T auxiliadora produzca suficientes niveles de citocinas que induzcan la expansión clonal. Bretscher, Immunol. Today 13: 74, 1992; June y otros, Immunol. Today 15:321, 1994. La principal señal co-estimuladora se produce cuando un miembro de los ligandos de la familia B7 (CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2)) en una célula presentadora de antígeno activada (APC) se une a CD28 en una célula T.

- 30 Los métodos de estimulación de la expansión de ciertos subconjuntos de células T tienen el potencial de generar una variedad de composiciones de células T útiles en la inmunoterapia. La inmunoterapia exitosa puede ayudarse aumentando la reactividad y la cantidad de las células T por estimulación eficiente. Además, en el contexto de la autoinmunidad o el trasplante, la inmunoterapia exitosa puede ayudarse por la eliminación de las células autorreactivas o alorreactiva indeseadas.

- 35 Las diversas técnicas disponibles para la expansión de las células T humanas se han basado principalmente en el uso de células accesorias y/o factores de crecimiento exógenos, tales como la interleucina- 2 (IL-2). La IL-2 se ha usado junto con un anticuerpo anti-CD3 para estimular la proliferación de células T, expandiendo predominantemente la subpoblación de células T CD8⁺. Se cree que se requieren ambas señales de APC dirigidas hacia el complejo TCR/CD3 y CD28 en la superficie de las células T para la activación óptima de células T, y la expansión y la supervivencia a largo plazo de las células T tras la re-infusión. El requisito de las APC pareadas a MHC como células accesorias presenta un problema importante para los sistemas de cultivo a largo plazo debido a que las APC son relativamente de corta duración. Por lo tanto, en un sistema de cultivo a largo plazo, las APC deben obtenerse continuamente a partir de una fuente y reponerse. La necesidad de un suministro renovable de células accesorias es problemático para el tratamiento de inmunodeficiencias en las que están afectadas las células accesorias. Adicionalmente, cuando se trata una infección viral, si las células accesorias llevan el virus, las células pueden contaminar la población entera de células T durante el cultivo a largo plazo.

- 50 En ausencia de factores de crecimiento exógenos o de células accesorias, puede enviarse una señal co-estimuladora a una población de células T, por ejemplo, exponiendo las células a un ligando CD3 y a un ligando CD28 unido a una superficie de fase sólida, tal como una perla. Ver C. June, y otros (patente de los Estados Unidos núm. 5,858,358); C. June y otros WO 99/953823. Si bien estos métodos son capaces de alcanzar poblaciones terapéuticamente útiles de células T, el aumento de robustez y la facilidad de preparación de células T continúan siendo menos que ideales.

- 55 Los métodos disponibles anteriormente en la técnica han hecho uso de anti-CD3 y anti CD28 para la expansión de células T. Shibuya y otros (Archives of Otolaryngology head and neck surgery, American Medical Association, Estados Unidos, Vol. 126, núm. 4, 2000) revelan un método de simulación de células T ex-vivo para superar la inmunosupresión relacionada con el tumor. Lum y otros (Journal of Immunotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Hagerstown, MD, Estados Unidos, Vol 24, núm. 5, 2001, P408-419) describe un proceso similar al de Shibuya y otros, donde el objetivo es activar las células T anti-

tumorales mediante su exposición a anticuerpos inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28. Adicionalmente, los métodos actualmente disponibles en la materia no se han centrado en la expansión a corto plazo de las células T o la obtención de una población más robusta de células T y los resultados beneficiosos de estas. Ninguno de estos métodos ha descrito el uso de tales métodos o similares para eliminar una población clonal u oligoclonal de células T indeseada a partir de una población de células T ni los resultados beneficiosos de estas. Por otra parte, los métodos previamente disponibles tienden a sesgar más aún la clonalidad de la población de células T en lugar de eliminar los clones reactivos indeseados de una población de células T, y restaurar un repertorio inmune normal. Para una máxima efectividad *in vivo*, teóricamente, una población de células T activadas, generadas *ex vivo* o *in vivo* debe estar en un estado que pueda orquestar al máximo una respuesta inmune al cáncer, enfermedad infecciosa, u otros estados de enfermedad. En el contexto de la autoinmunidad o el trasplante, las poblaciones de células T activadas deben estar en estado de reconstituir un repertorio de células T normales con una presencia reducida o completamente sin la presencia de células T autorreactivas o células T alorreactivas potencialmente patogénicas. Actualmente, los pacientes con enfermedades autoinmunes se tratan con inmunosupresión a largo plazo para inhibir las células T autorreactivas que causan la enfermedad. Cuando se detienen los agentes inmunosupresores, frecuentemente la enfermedad se repite concomitante con la reaparición las células T causantes de la enfermedad que resurgen en estos pacientes. El principal problema en el trasplante de células madre hematopoyéticas es la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), que es causada por las células T alorreactivas presentes en la preparación de células madre hematopoyéticas infundidas. En el trasplante de órganos, el rechazo del injerto mediado por células T alorreactivas del huésped es el principal problema, que por lo general se supera por la inmunosupresión a largo plazo del receptor del trasplante.

La presente invención proporciona métodos para generar un mayor número de células T más puras y altamente activadas que tienen receptor de superficie y características de producción de citocinas que parecen más sanos y naturales que otros métodos de expansión y además proporciona la disminución o eliminación de las poblaciones indeseadas de células T autorreactivas o alorreactivas. La presente invención es útil para proporcionar poblaciones de células T para su uso en el ajuste de las enfermedades autoinmunes, las células madre hematopoyéticas, y el trasplante de órganos, así como otros contextos en donde se desea la reconstitución de un sistema inmune de células T separadas por ablación, abrogado, o de otra manera disfuncional.

Además, cada vez es más reconocido que el envejecimiento del sistema inmunológico se caracteriza por una disminución progresiva de la capacidad de respuesta a los antígenos exógenos y tumores en combinación con un aumento paradójico de la autoinmunidad (C. Weyand y otros *Mechanisms of Ageing and Development* 102:131-147, 1998; D. Schmidt y otros *Molecular Medicine* 2:608-618, 1996; G. Liuzzo y otros *Circulation* 100:2135-2139, 1999). Estos estudios han descrito que el envejecimiento se asocia con la aparición de un subconjunto de células T cooperadoras que se caracterizan por la pérdida de la expresión de CD28. Las células T CD4⁺ CD28⁻ son de larga vida, típicamente experimentan expansión clonal *in vivo*, y reaccionan a los autoantígenos *in vitro*. La pérdida de la expresión de CD28 se correlaciona con la falta de expresión del ligando CD40 haciendo a estas células T CD4⁺ incapaces de promover la diferenciación de células B y la secreción de inmunoglobulinas. La acumulación de las células T CD4⁺ CD28⁻ relacionada con el envejecimiento resulta en un compartimiento inmunológico que está sesgado hacia respuestas autorreactivas y lejos de la generación de respuestas de las células B de alta afinidad contra antígenos exógenos.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención proporciona un método *ex vivo* para eliminar al menos una porción sustancial de una población de células T clonales de una población mixta de células T de un individuo, que comprende, exponer una población de células en donde al menos una porción de estas comprende células T a una o más composiciones pro-apoptóticas o inhibitoras del crecimiento en donde dicha exposición induce la apoptosis o la inhibición del crecimiento en al menos una porción sustancial de al menos una población de células T clonales presentes en la población mixta de células T; eliminando así al menos una porción sustancial de dicha célula T clonal de la población mixta, caracterizada porque la composición pro-apoptótica o inhibidora del crecimiento comprende un autoantígeno.

En una modalidad, el método comprende además expandir la población mixta de células T, exponiendo la población mixta de células T restante a la composición pro-apoptótica, en donde dicha exposición induce a la proliferación en la población mixta de células T. En una modalidad particular, la composición pro-apoptótica comprende anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 co-inmovilizados en una perla. En algunas modalidades, la composición pro-apoptótica usada para eliminar al menos una porción sustancial de dicha población de células T clonales de la población mixta de células T es la misma composición usada para expandir la población mixta de células T restante.

En una modalidad, el método comprende además expandir la población de células restante. En una modalidad, el método

comprende además expandir la población de células restante exponiendo la población de células restante a una superficie en donde la superficie tiene unido a esta uno o más agentes que ligan una porción de la superficie celular de al menos una porción de las células T restantes y estimula dichas células T restantes. En una modalidad relacionada, la superficie tiene unida a ella un primer agente que liga una primera porción de superficie de células T de una célula T, y la misma o una segunda superficie tiene unida a ella un segundo agente que liga una segunda porción de dicha célula T, en donde dicho ligamiento del primer y segundo agente induce la proliferación de dichas células T.

En una modalidad, el agente unido a la superficie es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En otra modalidad, el primer agente es un anticuerpo o un fragmento de este, y el segundo agente es un anticuerpo o un fragmento de este. En una modalidad el primer y el segundo agentes son anticuerpos diferentes. En una modalidad particular, el primer agente es un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD2, o un fragmento de anticuerpo de un anticuerpo anti-CD3 o anti-CD2. En otra modalidad, el segundo agente es un anticuerpo anti-CD28 o fragmento de anticuerpo de este. En una modalidad adicional, el primer agente es un anticuerpo anti-CD3 y el segundo agente es un anticuerpo anti-CD28.

En otra modalidad, las células se exponen a las superficies de la presente invención por un tiempo suficiente para aumentar la policlonalidad. En algunas modalidades, este aumento en la policlonalidad comprende un cambio de mono a oligoclonalidad o a policlonalidad de la población de células T medido por un perfil espectral tipo V β , V α , V γ o V δ de al menos un gen de la familia V β , V α , V γ o V δ .

Las composiciones pro-apoptóticas ilustrativas de la presente invención incluyen pero sin limitarse a anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-CD2, anticuerpo anti-CD28, anticuerpo anti-CD20, antígeno diana, tetrámeros MHC-péptido, ligando Fas, anticuerpo anti-Fas, IL-2, IL-4, TRAIL, rolipram, doxorubicina, clorambucil, fludarabina, ciclofosfamida, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, micofenolato, FK506, inhibidores de bcl-2, inhibidor de la topoisomerasa, agentes de unión a la enzima de conversión de la interleucina-1 β (ICE), proteína IpaB de Shigella, staurosporina, irradiación ultravioleta, irradiación gamma, factor de necrosis tumoral, moléculas de ácido nucleico antígeno diana, proteínas o péptidos, y compuestos no proteicos o no polinucleotídicos. En algunas modalidades, una o más de estas composiciones se usan al mismo tiempo.

En la presente invención, las composiciones pro-apoptóticas comprenden un autoantígeno. Los autoantígenos ilustrativos de la presente invención incluyen pero sin limitarse a, proteína básica de mielina (MBP), MBP 84-102, MBP 143-168, antígenos de la célula del islote pancreático, colágeno, CLIP-170, antígenos de las tiroides, ácido nucleico, receptor de acetilcolina, Antígeno S, y colágeno tipo II.

La presente invención puede ser útil en métodos para tratar enfermedades autoinmunitarias en un paciente que comprende administrar a un paciente las poblaciones de células T generadas por la presente invención, por ejemplo donde el paciente ha sido tratado con un agente quimioterapéutico antes de administrar la población de células T. Los agentes quimioterapéuticos ilustrativos incluyen pero sin limitarse a campath, anticuerpos anti-CD3, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, e irradiación. En otro ejemplo, el paciente se trata con una terapia ablativa de célula T antes de la administración de las poblaciones de células T generadas por la presente invención.

Un aspecto de la presente invención es un método *ex vivo* para la eliminación de al menos una porción sustancial de una población clonal de células T a partir de una población de células T, que comprende, proporcionar una población de células en donde al menos una porción de esta comprende las células T; exponer a la población de células a uno o más agentes que sensibilizan al menos una porción de las células T a una activación o estimulación adicionales, exponer a la población de células a una superficie en donde la superficie tiene unida a ella uno o más agentes que ligan una porción de superficie de la célula de al menos una porción de las células T sensibilizadas y estimula dichas células T sensibilizadas, en donde la exposición de dichas células T sensibilizadas a dicha superficie es durante un tiempo suficiente para inducir la apoptosis de dichas células T sensibilizadas; eliminando así dichas células T sensibilizadas de la población, caracterizada además porque la composición que sensibiliza comprende un autoantígeno. En una modalidad, el método comprende además la exposición de dicha población de células a dicha superficie durante un tiempo suficiente para estimular al menos una porción de las células T restantes y en donde al menos una porción de las células restantes prolifera. En una modalidad adicional, el método proporciona que dicha superficie tiene unida a ella un primer agente que liga una primera porción de superficie de células T de una célula T, y la misma o una segunda superficie tiene unida a ella un segundo agente que liga una segunda porción de dicha célula T, en donde dicho ligamiento del primero y segundo agente induce la proliferación de dicha célula T. En una modalidad, al menos un agente es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En otra modalidad, el primer agente es un anticuerpo o un fragmento de este, y el segundo agente es un anticuerpo o un fragmento de este. En aún otra modalidad, el primer y el segundo agentes son anticuerpos diferentes. En una modalidad relacionada, el primer agente es un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD2, o un fragmento de anticuerpo de un anticuerpo anti-CD3 o anti-

CD2. En aún otra modalidad, el segundo agente es un anticuerpo anti-CD28 o fragmento de anticuerpo de este. En otra modalidad, el primer agente es un anticuerpo anti-CD3 y el segundo agente es un anticuerpo anti-CD28.

En una modalidad relacionada, las células se exponen a dicha superficie por un tiempo suficiente para aumentar la policlonalidad. En otra modalidad, el aumento de la policlonalidad comprende un cambio de mono a oligoclonalidad o a policlonalidad de la población de células T medido por un perfil espectral de $V\beta$, $V\alpha$, $V\gamma$ o $V\delta$ de al menos un gen de la familia $V\beta$, $V\alpha$, $V\gamma$ o $V\delta$.

En algunas modalidades, el paciente requiere un trasplante de células madre hematopoyéticas. En una modalidad relacionada, la composición que sensibiliza a las PBMC receptoras que se trataron de manera que no sean capaces de seguir dividiéndose y la población de células comprende células T del donante. La presente invención puede ser útil en los métodos para reducir el riesgo de, o la gravedad de, un efecto adverso GVHD en un paciente que está experimentando un trasplante de células madre hematopoyéticas, que comprende la administración a dicho paciente de la población de células T producida de acuerdo con los métodos descritos en la presente invención. En algunas modalidades, los pacientes para recibir las células requieren un trasplante de órganos. En una modalidad relacionada, la composición que sensibiliza comprende a las células irradiadas del donante y la población de células comprende células T del receptor. Estas células se pueden administrar a un paciente que recibe un trasplante de órganos, para reducir el riesgo de rechazo del órgano. Por ejemplo, el paciente con trasplante de órgano se trata con una terapia ablativa de células T antes de la administración de la población de células T.

En un aspecto de la presente invención, la composición que sensibiliza comprende a un autoantígeno. Los autoantígenos ilustrativos de la presente invención incluyen pero sin limitarse a, proteína básica de mielina (MBP), MBP 84-102, MBP 143-168, antígenos de la célula del islote pancreático, Antígeno S, y colágeno tipo II. Un paciente con una enfermedad autoinmune puede tratarse mediante la administración de una población de células T generada de acuerdo con este método. El paciente puede tratarse con una terapia ablativa de células T antes de la administración de la población de células T.

La pureza de las células T $CD3^+/CD28^+$ puede ser al menos 90% pura. En otras modalidades, la pureza de las células T $CD3^+/CD28^+$ es 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, o 98% puras. La pureza de las células T $CD3^+/CD28^+$ puede ser al menos 99% puras. La pureza de las células T $CD3^+/CD28^+$ puede ser al menos 99.9% puras. La población de células T $CD3^+/CD28^+$ puede comprender menos que 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% o 0.1% células T $CD28^-$ contaminantes.

En una modalidad la molécula de superficie $CD3^+$ se estimula usando anticuerpos anti-CD3 y la molécula de superficie $CD28^+$ se estimula usando anticuerpos anti-CD28.

Una población sustancialmente pura de células T $CD3^+CD28^+$, que incluye células T $CD4^+CD3^+CD28^+$, y células T $CD8^+CD3^+CD28^+$ puede usarse en el tratamiento de personas que padecen de enfermedades autoinmunitarias tales como, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes dependiente de insulina, enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, síndrome de fatiga crónica, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, Fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, soriasis, síndrome de Sjogren, hipertiroidismo/enfermedad de Graves, hipotiroidismo/enfermedad de Hashimoto, diabetes dependiente de insulina (tipo 1), Miastenia Gravis, endometriosis, esclerodermia, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Wegener, glomerulonefritis, anemia aplásica, hemoglobinuria paroxismal nocturna, síndrome mielodisplásico, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune, síndrome de Evan, síndrome inhibidor del Factor VIII, vasculitis sistémica, dermatomiositis, polimiositis y fiebre reumática.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un gráfico de puntos que muestra la presencia de células T $CD3^+CD8^+$ específicas del antígeno HLA-A2CMVpp65 en un donante HLA-A2 positivo.

La Figura 2 es un gráfico de puntos que muestra un aumento en la expresión de CD25 en células T específicas del antígeno HLA-A2CMVpp65 activadas por CMV.

La Figura 3 es un gráfico de puntos que muestra la regulación positiva de CD25 en células re-estimuladas, y la supresión de las células tetrámero positivas pre-estimuladas (es decir, CMVpp65-Ag específicas) por la fuerte estimulación secundaria proporcionada por las perlas 3X28. El día 14 posterior a la estimulación primaria, los cultivos o se dejaron sin estimular (paneles A1-A4) o se volvieron a estimular mediante el proceso XCELLERATE™ con perlas 3X28 durante 16 horas (paneles B1-B4). CD25 se regula positivamente en las células re-estimuladas (Panel B2), pero las células

tetrámero positivas (es decir, CMVpp65-Ag-específicas) pre-estimuladas se eliminaron por la fuerte estimulación secundaria proporcionada por las perlas 3X28 (Panel B3).

La Figura 4 es un histograma que muestra el aumento de la expresión de moléculas efectoras clave, incluyendo CD95, en las células B leucémicas co-cultivadas con células T XCELLERATED™.

La Figura 5 es un gráfico de puntos que muestra la inducción de la apoptosis en las células B leucémicas co-cultivadas con células T XCELLERATED™.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la desaparición de las células B leucémicas durante el proceso de XCELLERATE™ y la expansión concomitante de las células T.

La Figura 7 es un gráfico que compara el aumento múltiple de células T policlonales con el aumento múltiple de células T CMV pp65 A2-tetrámero+ (antígeno específicas) usando diferentes relaciones perla:célula. Las barras sólidas representan las células T policlonales. Las barras rayadas representan las células T específicas de CMV.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de exponer la invención, puede ser útil para la comprensión de esta exponer las definiciones de ciertos términos que se utilizarán de aquí en adelante.

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

El término "estimulación", como se usa en la presente, se refiere a la respuesta primaria inducida por ligación de una porción de superficie celular. Por ejemplo, en el contexto de los receptores, tal estimulación implica la unión de un receptor y un evento posterior de transducción de la señal. Con respecto a la estimulación de una célula T, tal estimulación se refiere a la ligación de una porción de superficie de la célula T que en una modalidad subsecuentemente induce un evento de transducción de señales, tal como la unión del complejo TCR/CD3. Además, el evento de estimulación puede activar una célula y regular positiva o negativamente la expresión de moléculas de la superficie celular tales como receptores o moléculas de adhesión, o regular positiva o negativamente la secreción de una molécula, tal como la regulación negativa del factor de crecimiento tumoral beta (TGF-β). Por lo tanto, la ligación de porciones de la superficie celular, incluso en ausencia de un evento directo de transducción de señales, puede resultar en la reorganización de las estructuras del citoesqueleto, o en la coalescencia de porciones de la superficie celular, cada uno de los cuales podría servir para mejorar, modificar, o alterar respuestas celulares subsiguientes.

El término "activación", como se usa en la presente, se refiere al estado de una célula después de una ligación suficiente de la porción superficie celular para inducir un cambio morfológico, fenotípico, y/o funcional medible. En el contexto de las células T, tal activación puede ser el estado de una célula T que ha sido suficientemente estimulada para inducir la proliferación celular. La activación de una célula T además puede inducir la producción de citocinas y/o la secreción, y la regulación positiva o negativa de la expresión de moléculas de superficie celular tales como receptores o moléculas de adhesión, o la regulación positiva o negativa de la secreción de algunas moléculas, y el desempeño de las funciones efectoras reguladoras o citolíticas. En el contexto de otras células, este término infiere regulación ya sea positiva o negativa de un proceso físico-químico en particular.

El término "célula diana", como se usa en la presente, se refiere a cualquier célula que pretende ser estimulada por ligación de la porción de la superficie celular.

Un "anticuerpo", como se usa en la presente, incluye los anticuerpos policlonales y monoclonales (mAb); primatizados (por ejemplo, humanizados); murino; de ratón-humano; de ratón-primate; y quimérico; y puede ser una molécula intacta, un fragmento de esta (tal como los fragmentos scFv, Fv, Fd, Fab, Fab' y F(ab)'₂), o multímeros o agregados de moléculas intactas y/o fragmentos; y puede ser de origen natural o ser producido, por ejemplo, por inmunización, síntesis o ingeniería genética; un "fragmento de anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere a los fragmentos, derivados de o relacionados con un anticuerpo, que se une al antígeno y el cual en algunas modalidades puede ser derivatizado para exhibir características estructurales que facilitan el despacho y la absorción, *por ejemplo*, por la incorporación de residuos de galactosa. Este incluye, *por ejemplo*, F(ab), F(ab)'₂, scFv, región variable de cadena ligera (V_L), región variable de cadena pesada (V_H), y combinaciones de los mismos.

El término "proteína", como se usa en la presente, incluye proteínas, glicoproteínas y otras proteínas modificadas derivadas de células, polipéptidos y péptidos, y puede ser una molécula intacta, un fragmento de esta, o multímeros o agregados de moléculas intactas y/o fragmentos; y pueden existir en la naturaleza o ser producidos, *por ejemplo*, por síntesis (incluyendo química y/o enzimática) o ingeniería genética.

El término "agente", "ligando", o "agente que se une a una porción de la superficie celular", como se usa en la presente, se refiere a una molécula que se une a una población definida de células. El agente puede unir cualquier porción de la superficie celular, tal como un receptor, un determinante antigénico, u otro sitio de unión presente en la población de células diana. El agente puede ser una proteína, péptido, anticuerpo y fragmentos de anticuerpo de este, proteínas de fusión, molécula sintética, una molécula orgánica (*por ejemplo*, una molécula pequeña), o similares. Dentro de la especificación y en el contexto de la estimulación de células T, los anticuerpos se utilizan como un ejemplo prototípico de tal agente.

El término "porción de la superficie celular" como se usa en la presente puede referirse a un receptor de la superficie celular, un determinante antigénico, o cualquier otro sitio de unión presente en una población de células diana.

Los términos "agente que se une una porción de la superficie celular" y "porción de la superficie celular", como se usa en la presente, debe ser visto como un conjunto complementario/anti-complementario de moléculas que demuestran unión específica, generalmente de afinidad relativamente alta.

Una "señal co-estimuladora", como se usa en la presente, se refiere a una señal, que en combinación con una señal primaria, tal como la ligación TCR/CD3, conduce a la proliferación y/o activación de células T.

"Separación", como se usa en la presente, incluye cualquier medio de purificar sustancialmente un componente a partir de otro (*por ejemplo*, por filtración, afinidad, densidad de flotación o atracción magnética).

Una "superficie", como se usa en la presente, se refiere a cualquier superficie capaz de tener un agente unido a él e incluye, sin limitarse a, metales, vidrio, plásticos, copolímeros, coloides, lípidos, superficies celulares, y similares. Esencialmente cualquier superficie que es capaz de retener un agente unido o fijado a ella.

"Monoclonalidad", como se usa en la presente, en el contexto de una población de células T, se refiere a una población de células T que tiene una especificidad única como se define por análisis espectral tipo (una medida del repertorio de región hipervariable de la cadena V β , V α , V γ , o V δ del TCR). Una población de células T se considera monoclonal (o mono-específica) cuando el perfil espectral tipo V β , V α , V γ , y/o V δ para una familia V β , V α , V γ , y/o V δ dada del TCR tiene un pico predominante único. El análisis espectral distingue genes variables reordenados de un tamaño particular, no la secuencia. Así, se entiende que un solo pico podría representar una población de células T que expresan cualquiera de un número limitado de genes variables reordenados TCR (V β , V α , V γ , o V δ) que comprende uno cualquiera de los 4 nucleótidos posibles (adenina (a), guanina (g), citosina (c), o timina (t)) o una combinación de los 4 nucleótidos en la región de unión. En algunas modalidades de la presente invención, se puede desear clonar y secuenciar una banda en particular para determinar la(s) secuencia(s) del(los) gen(es) variable(s) reordenado(s) presente(s) en la banda que representa una longitud particular.

"Oligoclonalidad", como se usa en la presente, en el contexto de una población de células T, se refiere a una población de células T que tiene especificidad antigénica múltiple, pero estrecha. Esto puede ser definido por análisis espectral tipo (una medida del repertorio de región hipervariable de la cadena V β , V α , V γ , o V δ del TCR). Una población de células T se considera oligoclonal cuando el perfil espectral tipo V β para una familia V β , V α , V γ , o V δ del TCR dada tiene entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 picos predominantes. Esto además puede definirse por la generación y caracterización de clones específicos de antígeno a un antígeno de interés.

"Policlonalidad", como se usa en la presente, en el contexto de una población de células T, se refiere a una población de células T que tiene especificidad antigénica múltiple y amplia. Esto puede ser por análisis espectral tipo (una medida del repertorio de región hipervariable de la cadena V β , V α , V γ , o V δ del TCR). Una población de células T se considera policlonal cuando el perfil espectral tipo V β para una familia V β , V α , V γ , o V δ del TCR dada tiene múltiples picos, típicamente 5 o más picos predominantes y en la mayoría de los casos con distribución Gaussiana. La policlonalidad además puede definirse por la generación y caracterización de clones específicos de antígeno a un antígeno de interés.

"Restauración o aumento de la policlonalidad", como se usa en la presente, se refiere a un cambio de un perfil monoclonal a un perfil oligoclonal o a un perfil policlonal, o a partir de un perfil oligoclonal a un perfil policlonal, en genes TCR V β , V α , V γ , y/o V δ expresados en una población de células T, tal como se mide por análisis espectral o por análisis similar tal como citometría de flujo o análisis de la secuencia. El cambio de un perfil de expresión V β , V α , V γ , y/o V δ monoclonal en una población de células T a un perfil oligoclonal o a un perfil policlonal se observa generalmente en al menos una familia V β , V α , V γ , y/o V δ del TCR. En una modalidad de la presente invención, este cambio se observa en 2, 3, 4, o 5 familias V β . En algunas modalidades de la presente invención, se observa un cambio en 6, 7, 8, 9, o 10 familias V β . En una modalidad adicional de la presente invención, se observa un cambio en 11, 12, 13, o 14 familias V β . En una modalidad adicional de la

presente invención, se observa un cambio en 15 a 20 familias V β . En una modalidad adicional de la presente invención, se observa un cambio en 20 a 24 familias V β . En otra modalidad, se observa un cambio en todas las familias V β . La importancia funcional de la restauración o el aumento de la policlonalidad de una población de células T es que el potencial inmunológico, o la capacidad de responder a una amplitud completa de antígenos, de la población de células T se restaura o se incrementa. En algunos aspectos de la presente invención, algunas células T dentro de una población no pueden tener sus TCR ocupados por los métodos que se exponen en la presente invención (*por ejemplo*, las células T con expresión de TCR regulada negativamente). Sin embargo, por estar en estrecha proximidad a las células T activadas por los métodos descritos en la presente invención, y de los factores secretados por ellas, estas células T pueden a su vez regular positivamente su expresión de TCR que de ese modo resulta en un aumento adicional en la policlonalidad de la población de células T. La restauración o incremento de la policlonalidad pueden medirse además mediante la determinación de la amplitud de la respuesta a un antígeno particular de interés, por ejemplo midiendo el número de diferentes epítomos reconocidos por las células antígeno específicas. Esto puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar para la generación y clonación *in vitro* de células T antígeno específicas.

El término "población clonal de células T" como se usa en la presente, se refiere a una población de células T que tiene un determinado intervalo de especificidades contra un antígeno diana dado. Esto se puede medir por cualquier número de ensayos conocidos en la materia, por ejemplo mediante la generación y medición de la amplitud de las especificidades (es decir número de diferentes especificidades) de los clones específicos de antígeno en una población dada. Una población clonal de células T puede definirse además por tener especificidad tanto monoclonal como oligoclonal tal como se define por análisis espectral (una medida del repertorio de la región hipervariable de la cadena V β , V α , V γ , o V δ del TCR).

El término "animal" o "mamífero" como se usa en la presente, abarca todos los mamíferos, incluyendo los humanos. Preferentemente, el animal de la presente invención es un sujeto humano.

El término "exponer" como se usa en la presente, se refiere a la puesta en un estado o condición de proximidad inmediata o contacto directo.

El término "proliferación" como se usa en la presente, significar crecer o multiplicar por la producción de nuevas células.

"Respuesta inmune o capacidad de respuesta" como se usa en la presente, se refiere a la activación de las células del sistema inmune, incluyendo, pero sin limitarse a, células T, de tal manera que una(s) función(es) efectora(s) en particular de una célula particular, se induce(en). Las funciones efectoras pueden incluir, pero sin limitarse a, proliferación, secreción de citocinas, la secreción de anticuerpos, expresión de moléculas reguladoras y/o adhesión, y la capacidad para inducir la citólisis.

"La estimulación de una respuesta inmune", como se usa en la presente, se refiere a cualquier estimulación de tal manera que se logran la activación y la inducción de las funciones efectoras de las células del sistema inmune.

"Disfunción de la respuesta inmune", como se usa en la presente, se refiere a la activación inapropiada y/o proliferación, o la falta de esta, de las células del sistema inmune, y/o la secreción inapropiada, o la falta de esta, de citocinas, y/o la inducción inapropiada o inadecuada de otras funciones efectoras de las células del sistema inmune, tales como la expresión de receptores reguladores, de adhesión, y/o de alojamiento, y la inducción de citólisis.

"Partículas" o "superficie", como se usa en la presente, puede incluir una partícula coloidal, una microesfera, una nanopartícula, una perla, o similares. Una superficie puede ser cualquier superficie capaz de tener un ligando unido a ella o integrado en ella, incluyendo superficies celulares (por ejemplo células K562), y que es biocompatible, es decir, sustancialmente no tóxico para las células diana a estimular. En las distintas modalidades, las superficies comercialmente disponibles, tales como perlas u otras partículas, son útiles (*por ejemplo*, Partículas Miltenyi, Miltenyi Biotec, Alemania; perlas de Sefarosa, Pharmacia Fine Chemicals, Suecia; DYNABEADS™, Dynal Inc., Nueva York; PURABEADS™, Prometic Biosciences, perlas magnéticas de Immunicon, Huntingdon Valley, PA, microesferas de Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN).

"Partículas paramagnéticas" como se usa en la presente, se refiere a partículas, como se definió anteriormente, que se localizan en respuesta a un campo magnético.

Una "composición pro-apoptótica" "composiciones apoptóticas" o "inductor de la apoptosis", como se usa en la presente se refiere a cualquier composición o estímulo que incremente la actividad apoptótica de una célula cuando se administra solo o junto con otras composiciones pro-apoptóticas. Las composiciones pro-apoptóticas usadas en los métodos de la presente

invención inducen preferentemente la apoptosis en células T activadas, NKT, NK o células B. En algunas modalidades, una composición pro-apoptótica de la presente invención inducirá la apoptosis sin activación/estimulación adicional. Los ejemplos ilustrativos de tales composiciones o estímulos incluyen, pero sin limitarse a, privación de un factor de crecimiento, condiciones oxidantes, estrés por calor, privación de suero, acetato de forbol miristato (PMA) e ionomicina, superantígenos (*por ejemplo*, SEA, SEB, y similares) diversos anticuerpos, tales como anti-CD2, anti-CD3, anti-CD28, anti-CD20, anticuerpo anti-Fas, o cualquier combinación de estos, tetrámeros o dímeros de MHC-péptido, ligando Fas, IL -2, IL-4, TRAIL, rolipram, doxorubicina, clorambucilo, fludarabina, corticosteroides, glucocorticoides, ciclosporina, ciclofosfamida, FK506, azatioprina, metotrexato, micofenolato, anexina, caspasas, inhibidores de Bcl-2, inhibidores de la topoisomerasa, agentes de unión a la enzima convertidora de interleucina-1 β (ICE), proteína Shigella lpaB, estaurosporina, irradiación ultravioleta, irradiación gamma, radiación, factor de necrosis tumoral, diversos inhibidores de histona desacetilasa, y otros bien conocidos en la materia. En algunas modalidades, las composiciones pro-apoptóticas comprenden una superficie, tal como una perla magnética, que tiene unida a ella uno o más agentes que se une a una porción de la superficie celular. Con respecto a esto, el agente puede ser cualquier agente como se describe en la presente invención. En una modalidad, la superficie tiene unido a ella al menos anticuerpos anti-CD3. En otra modalidad, la superficie tiene unido a ella anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Adicionalmente, un estimulador de la apoptosis puede ser un polipéptido que es capaz de incrementar o inducir la actividad apoptótica de una célula. Tales polipéptidos incluyen aquellos que regulan directamente la vía de apoptosis tales como Bax, Bad, Bcl-Xs, Bak, Bik, y caspasas activas así como también aquellos que indirectamente regulan la vía. En algunas modalidades, la composición pro-apoptótica comprende células T activadas, tales como las células T XCELLERATED™ (tal como las descritas en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 10/133,236), particularmente para inducir apoptosis en poblaciones de células B. Otras composiciones pro-apoptóticas ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, células irradiadas (*por ejemplo* dadoras o receptoras (células alogénicas)), antígenos diana (*por ejemplo* antígenos diana autoinmunes definidos, *por ejemplo*, en esclerosis múltiple, el antígeno diana identificado como proteína básica de mielina (MBP) MBP 84-102, o MBP 143-168; antígenos de la célula del islote pancreático; en uveítis, el Antígeno S; o en artritis reumatoide, colágeno tipo II u otros tipos; en la enfermedad de Grave, receptor de tiroides; en Miastenia gravis, receptor de acetilcolina), proteína enlazadora citoplasmática-170 (CLIP-170), moléculas de ácido nucleico, proteínas o péptidos, y compuestos no proteicos o no polinucleotídicos.

Una "composición que sensibiliza a las células a una activación o estimulación adicional" o "composición de sensibilización" como se usa en la presente es cualquier composición que sensibiliza a las células para la posterior activación/estimulación. Tras la activación/estimulación posterior, las células sensibilizadas experimentan apoptosis. Las composiciones de sensibilización de la presente invención además sensibilizan a las células a los efectos de las composiciones pro-apoptóticas. Composiciones ilustrativas que sensibilizan las células a la activación adicional, la estimulación, o los efectos de las composiciones pro-apoptóticas incluyen células que han sido tratadas de tal manera que no son capaces de seguir dividiéndose, *por ejemplo*, por irradiación, (*por ejemplo*, células del donante o el receptor (alogénico)), superantígenos (*por ejemplo*, SEA, SEB, y similares), los antígenos diana (*por ejemplo* antígenos diana autoinmunes definidos *por ejemplo*, en la esclerosis múltiple, el antígeno diana identificado como la proteína básica de la mielina (MBP) MBP 84-102 o MBP 143-168; antígenos de células de los islotes pancreáticos; en uveítis, el antígeno S, o en la artritis reumatoide, de tipo II o de otros tipos de colágeno; en la enfermedad de Grave, receptor tiroideo; en Miastenia gravis, receptor de acetilcolina, moléculas de ácidos nucleicos, proteínas o péptidos, y compuestos no proteicos o no polinucleotídicos), proteína, glicoproteína, péptidos, complejos anticuerpo/antígeno, lisado de células, restos celulares no solubles, cuerpos apoptóticos, células necróticas, células enteras de una línea celular que han sido tratadas de tal manera que se son incapaces de seguir dividiéndose, carbohidratos complejos naturales o sintéticos, lipoproteínas, células transformadas o línea celular, células transfectadas o línea celular, o células transducidas o línea celular, o cualquier combinación de estos.

La apoptosis, para los propósitos de la presente invención, se define como la muerte celular programada. La apoptosis es una muerte celular programada, que es un fenómeno generalizado que juega un papel crucial en la gran cantidad de procesos fisiológicos y patológicos. La apoptosis se produce en la embriogénesis, la metamorfosis, la atrofia dependiente del tejido endocrino, el recambio normal de los tejidos, y la muerte de timocitos inmunes (inducida a través de su complejo antígeno-receptor o por glucocorticoides) (Itoh y otros, Cell, 66:233, 1991). Durante la maduración de las células T en el timo, las células T que reconocen autoantígenos se destruyen a través del proceso de apoptosis, mientras que otros se seleccionan positivamente. Se ha sugerido la posibilidad de que algunas células T que reconocen algunos epítomos propios (*por ejemplo*, determinantes antigénicos de una proteína propia dada ineficientemente procesados y presentados) escapen a este proceso de eliminación y posteriormente jueguen un papel en las enfermedades autoinmunes. (Gammon y otros, Immunology Today 12:193, 1991). La necrosis es una muerte celular accidental que es la respuesta de la célula a una variedad de condiciones nocivas y sustancias tóxicas. La apoptosis, morfológicamente distinta de la necrosis, es una forma espontánea de muerte celular que ocurre en muchos tejidos diferentes bajo varias condiciones. La apoptosis ocurre en dos etapas. La célula experimenta una condensación nuclear y citoplásmica, y eventualmente se puede romper en un número de fragmentos unidos a membrana que contienen cuerpos apoptóticos estructuralmente intactos, que son fagocitados por

las células vecinas y degradados rápidamente. Alternativamente, las células que entran en la ruta apoptótica pueden fagocitarse antes de la degeneración a cuerpos unidos a la membrana. La apoptosis se observa en muchos tejidos diferentes, sanos y neoplásicos, adulto y embrionario. La muerte se produce de forma espontánea, o se induce por agentes fisiológicos o nocivos. La apoptosis es un proceso fisiológico básico que juega un papel importante en la regulación de las poblaciones de células.

Los métodos para medir la apoptosis son bien conocidos en la materia. La apoptosis puede determinarse por métodos tales como, por ejemplo, escalera de ADN, microscopía óptica o electrónica, citometría de flujo, y diferentes kits disponibles comercialmente para la determinación de la apoptosis.

Como se usa en la presente, una "composición inhibidora de crecimiento" es cualquier sustancia que inhibe el crecimiento en las células, o de cualquier otra manera vuelve a las células disfuncionales e incapaces de dividirse lo mismo cuando se administra sola que junto con otras composiciones de la presente invención. Las composiciones inhibidoras del crecimiento usadas en los métodos de la presente invención inhiben preferentemente el crecimiento en las células T activadas, células NKT, NK o B. Los ejemplos ilustrativos de tales composiciones o estímulos incluyen, pero sin limitarse a, privación de un factor de crecimiento, condiciones oxidantes, estrés por calor, privación de suero, acetato de forbol miristato (PMA) e ionomicina, superantígenos (por ejemplo, SEA, SEB, y similares) diversos anticuerpos, tales como anti-CD2, anti-CD3, anti-CD28, anti-CD20, anticuerpo anti-Fas, o cualquier combinación de estos, tetrámeros o dímeros de MHC-péptido, ligando Fas, IL -2, IL-4, TRAIL, rolipram, doxorubicina, clorambucil, fludarabina, corticosteroides, glucocorticoides, ciclosporina, ciclofosfamida, FK506, azatioprina, metotrexato, micofenolato, anexina, caspasas, inhibidores de Bcl-2, inhibidores de la topoisomerasa, agentes de unión a la enzima convertidora de interleucina-1 β (ICE), proteína Shigella IpaB, estaurosporina, irradiación ultravioleta, irradiación gamma, radiación, factor de necrosis tumoral, diversos inhibidores de histona desacetilasa, y otros bien conocidos en la materia. En algunas modalidades, las composiciones inhibidoras de crecimiento comprenden una superficie, tal como una perla magnética, que tiene unido a ella uno o más agentes que se unen a una porción de la superficie celular. Con respecto a esto, el agente puede ser cualquier agente como se describe en la presente invención. En una modalidad, la superficie tiene unida a ella al menos anticuerpos anti-CD3. En otra modalidad, la superficie tiene unida a ella anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Adicionalmente, una composición inhibidora del crecimiento puede comprender un polipéptido que es capaz de inhibir el crecimiento de una célula. Tales polipéptidos incluyen aquellos péptidos tales como Bax, Bad, Bcl-xS, Bak, Bik, y caspasas activas. Otras composiciones inhibidoras del crecimiento ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, células irradiadas (*por ejemplo* dadoras o receptoras (células alogénicas)), antígenos diana (*por ejemplo* antígenos diana autoinmunes definidos por ejemplo, en esclerosis múltiple, el antígeno diana identificado como proteína básica de mielina (MBP) MBP 84-102, o MBP 143-168; antígenos de la célula del islote pancreático; en uveítis, el Antígeno S; o en artritis reumatoide, colágeno tipo II u otros tipos; en la enfermedad de Grave, receptor de tiroides; en Misticia gravis, receptor de acetilcolina), proteína enlazadora citoplasmática-170 (CLIP-170), moléculas de ácido nucleico, proteínas o péptidos, y compuestos no-proteínas o no-polinucleótidos.

Como se usa en la presente, una población "sustancialmente pura" de células T CD3⁺/CD28⁺ es una población de células que está formada por al menos aproximadamente 90% de células T CD3⁺/CD28⁺. En algunos aspectos de la invención una población "sustancialmente pura" de células T CD3⁺/CD28⁺ es una población de células que está formada por al menos aproximadamente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, o 98% de células T CD3⁺/CD28⁺, preferentemente al menos aproximadamente 99%, y aún con mayor preferencia aproximadamente 99.9% o más.

FUENTES DE POBLACIONES MIXTAS DE CÉLULAS

En una modalidad, las células que se exponen a las composiciones pro-apoptóticas o inhibidoras del crecimiento y/o composiciones sensibilizantes son de la sangre circulante de un individuo y que se obtienen a partir de una o más unidades de sangre o de una aféresis o leucaféresis. El producto de aféresis típicamente contiene linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otras células blancas nucleadas de la sangre, células rojas de la sangre, y plaquetas. Antes de la exposición a una composición de sensibilización y la posterior activación y/o estimulación, se obtiene una fuente de células T a partir de un sujeto. El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que puede obtenerse una respuesta inmune (*por ejemplo*, mamíferos). Los ejemplos de sujetos incluyen humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de estos. Las células T pueden obtenerse de un número de fuentes, que incluyen células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, tejido de ganglio linfático, tejido linfóide asociado al intestino, tejido linfóide asociado a la mucosa, tejido del bazo, o cualquier otro tejido linfóide, y tumores. Las células T pueden obtenerse de líneas de células T y de fuentes autólogas o alogénicas. Las células T pueden obtenerse además de una fuente xenogénica, por ejemplo, de ratón, rata, primate no-humano, y cerdo. En algunas modalidades de la presente invención, las células T pueden obtenerse de una unidad de sangre recogida de un sujeto usando cualquier número de técnicas conocidas por un técnico con experiencia, tal como la separación ficoll. En una modalidad preferida, las

células de sangre circulante de un individuo se obtiene por aféresis o leucaféresis. El producto de aféresis típicamente contiene linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otras células blancas nucleadas de la sangre, células rojas de la sangre, y plaquetas. En una modalidad, las células colectadas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción de plasma y para colocar las células en un tampón o medio adecuado para posteriores etapas de procesamiento.

- 5 En una modalidad de la invención, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una modalidad alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos si no de todos los cationes divalentes. Como los expertos en la materia apreciarán fácilmente una etapa de lavado puede llevarse a cabo por métodos conocidos por expertos en la materia, tales como mediante el uso de una centrífuga semi-automatizada de "flujo continuo" (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, Baxter) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 10 Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS libre de calcio (Ca), y libre de magnesio (Mg). Alternativamente, los componentes indeseados de la muestra de la aféresis pueden eliminarse y las células resuspenderse directamente en medios de cultivo.

- 15 En otra modalidad, las células T se aíslan de linfocitos de sangre periférica por lisis o eliminando las células de sangre roja y agotando los monocitos, por ejemplo, por centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL™. Una subpoblación específica de células T, tal como células T CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, y CD45RO⁺, puede aislarse además por técnicas de selección positivas o negativas. Por ejemplo, en una modalidad preferida, las células T se aíslan por incubación con perlas conjugadas de anti-CD3/anti-CD28 (es decir, 3x28, tales como CD3/CD28 T DYNABEADS® M-450, por un periodo de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. En una modalidad, aproximadamente 30 minutos.
- 20 En una modalidad adicional, el periodo de tiempo está en el intervalo de 30 minutos a 36 horas o más largo y todos los valores enteros entre ellos. En una modalidad adicional, el periodo de tiempo es al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 horas. En aún otra modalidad preferida, el periodo de tiempo es 10 a 24 horas. En una modalidad preferida, el periodo del tiempo de incubación es 24 horas. Para el aislamiento de células T de pacientes con leucemia, el uso de tiempos de incubación más largos, tal como 24 horas, puede aumentar el rendimiento de la célula. Tiempos de incubación más largos pueden usarse para aislar células T en cualquier situación donde hay pocas células T comparado con otros tipos de célula, como en el aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más largos puede aumentar la eficiencia de captura de las células T CD8⁺. Por ejemplo, las células T CD3⁺ CD28⁺ pueden seleccionarse positivamente usando perlas magnéticas conjugadas con CD3/CD28 (por ejemplo, Expansor de células CD3/CD28 T DYNABEADS® M-450). En un aspecto de la presente invención, el enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa puede lograrse con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células negativamente seleccionadas. Un método preferido es la separación de células y/o la selección a través de inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que usa un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular presentes en las células negativamente seleccionadas. Por ejemplo, para enriquecer en células CD4⁺ por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales incluye típicamente anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, y CD8.
- 35

- La presente invención puede permitir la provisión de una población de células T o la composición que se redujo o enriqueció en poblaciones de células que expresan una variedad de marcadores, tales como CD62L, CD45RA o CD45RO, citocinas (por ejemplo, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10), receptores de citocinas (por ejemplo CD25), perforina, moléculas de adhesión (por ejemplo VLA-1, VLA-2, VLA-4, LPAM-1, LFA-1), y/o moléculas de alojamiento (por ejemplo, L-selectina), antes de la sensibilización, la estimulación y la expansión. Las células que expresan cualquiera de estos marcadores se reducen o se seleccionan positivamente por anticuerpos u otros ligandos/agentes de unión dirigidos al marcador. El experto en la materia fácilmente será capaz de identificar una variedad de metodologías particulares para reducir o seleccionar positivamente una muestra de células que expresan un marcador deseado.
- 40

- 45 Las poblaciones de monocitos (es decir, células CD114⁺) pueden reducirse de preparaciones de sangre antes de la expansión *ex vivo* mediante una variedad de metodologías, incluyendo perlas o columnas recubiertas con anti-CD 14, o la utilización de la actividad fagocítica de estas células para facilitar la eliminación o mediante la adhesión a plástico. En consecuencia, en una modalidad, la invención usa partículas paramagnéticas de un tamaño suficiente para ser envueltas por los monocitos fagocíticos. En algunas modalidades, las partículas paramagnéticas son perlas disponibles comercialmente, por ejemplo, aquellas producidas por Dynal AS bajo el nombre comercial DYNABEADS™. Las DYNABEADS™ ilustrativas con respecto a esto son M-280, M-450, y M-500. En un aspecto, otras células no específicas se eliminan por recubrimiento de las partículas paramagnéticas con proteínas "irrelevantes" (por ejemplo, proteínas del suero o anticuerpos). Las proteínas y anticuerpos irrelevantes incluyen aquellas proteínas y anticuerpos o fragmentos de estos que no están orientados específicamente a las células T a expandir. En algunas modalidades las perlas irrelevantes incluyen perlas recubiertas con anticuerpos de oveja anti-ratón, anticuerpos de cabra anti-ratón, y albúmina de suero humano.
- 50
- 55

[0062] En resumen, tal reducción de monocitos se realiza por preincubación de las PBMC que se han aislado a partir de

sangre total utilizando Ficoll, o de la sangre periférica de aféresis con una o más variedades de partículas paramagnéticas irrelevantes o acopladas a no-anticuerpo en cualquier cantidad que permita la eliminación de los monocitos (aproximadamente una relación perla:célula de 20:1) durante aproximadamente 30 minutos a 2 horas a 22 a 37 grados C, seguido de la eliminación magnética de las células que se han unido o envuelto a las partículas paramagnéticas. La preincubación puede realizarse además a temperaturas tan bajas como 3-4 grados C. Esta separación puede realizarse usando métodos estándar disponibles en la materia. Por ejemplo, cualquier metodología de separación magnética puede usarse incluyendo una variedad de las que están disponibles comercialmente, (*por ejemplo*, Concentrador de Partículas Magnéticas DYNAL[®] (DYNAL MPC[®])). El aseguramiento del requisito de reducción puede controlarse por una variedad de metodologías conocidas por los expertos en la materia, incluyendo análisis de citometría de flujo de células CD14 positivas, antes y después de dicha reducción.

[0063] Las células T a exponer a composiciones pro-apoptóticas y/o de sensibilización y posterior estimulación pueden además ser congeladas después de la etapa de lavado, que no requiere de la etapa de eliminación de monocitos. Deseando no estar atados por la teoría, la etapa de congelación y posterior descongelación proporciona un producto más uniforme mediante la eliminación de los granulocitos y en cierta medida de los monocitos en la población de células. Después de la etapa de lavado que eliminan el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Mientras que muchas soluciones y parámetros de congelación son conocidos en la materia y serán útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contiene una concentración final de DMSO al 10% y albúmina de suero humano al 4%, o de otros medios de congelación de células adecuados, las células son después congeladas a -80°C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

ELIMINACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES INDESEADAS DE CÉLULAS A PARTIR DE UNA POBLACIÓN MIXTA DE CÉLULAS

Exposición Directa a Composiciones Pro-apoptóticas

La presente invención proporciona métodos para eliminar al menos una porción de las poblaciones clonales indeseadas de células T a partir de una población de células inmunes

Las poblaciones de células indeseadas pueden eliminarse o reducirse en una cantidad estadísticamente significativa directamente a través de la exposición de dichas células a una composición pro-apoptótica. La exposición a la composición pro-apoptótica puede tener lugar *in vivo* o *in vitro*. Sin estar atados por la teoría, se cree que las células previamente activadas son más sensibles a composiciones apoptóticas que las células vírgenes o no activadas. Por lo tanto, la exposición a composiciones apoptóticas *in vivo* o *in vitro*, usando dosis y condiciones que inducen apoptosis, matará selectivamente las células altamente activadas tales como las células autorreactivas indeseadas en un paciente.

Así, la presente invención proporciona métodos para la eliminación de al menos una porción sustancial de cualquier subpoblación indeseada de células T clonales de una población mixta de células inmunes. Para los propósitos de la presente invención, una porción sustancial significa al menos 70% de la subpoblación indeseada de células. En algunas modalidades, una porción sustancial significa 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y más de la subpoblación indeseada de células. La eliminación de las células puede medirse usando cualquier número de técnicas conocidas en la materia, que incluyen pero sin limitarse a, análisis de citometría de flujo usando una variedad de anticuerpos y/o tetrámeros de péptido-MHC y ensayos funcionales tales como la proliferación y ensayos de liberación de cromo.

Las composiciones pro-apoptóticas o inductoras de la apoptosis se refiere a cualquier composición o estímulo que aumenta la actividad apoptótica de una célula cuando se administra sola o en conjunto con otras composiciones pro-apoptóticas. Las composiciones pro-apoptóticas usadas en los métodos de la presente invención preferentemente inducen la apoptosis en células T activadas, células NKT, células NK, y células B. La cantidad y condiciones bajo las cuales las composiciones pro-apoptóticas inducen la apoptosis deseada pueden variar y pueden ser determinadas por el técnico con experiencia usando optimización de rutina. En algunas modalidades, una composición pro-apoptótica de la presente invención inducirá la apoptosis sin activación/estimulación posterior. Los ejemplos ilustrativos de esos agentes o estímulos incluyen, pero sin limitarse a, reducción de un factor de crecimiento, condiciones oxidantes, estrés por calor, estrés por congelación-descongelación, privación de suero, varios anticuerpos, tales como el anticuerpo anti-CD2, anti-CD3, anti-CD28, anti-CD20, o anti-Fas; tetrámeros de MHC-péptido; ligando Fas, TRAIL, FR901228 (como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 6,403,555), FK506, annexina, caspasas, citocinas tal como IL-2 o IL-4, ciclofosfamida, agentes quimioterapéuticos, UV, esteroides, corticosteroides, glucocorticoides, rolipram, doxorubicina, clorambucil, fludarabina, inhibidores de bcl-2, inhibidores de la topoisomerasa, agentes de unión a la enzima de conversión de la interleucina-1 β (ICE), proteína IpaB de Shigella, inhibidores de staurosporina, irradiación ultravioleta, irradiación gamma, radiación, factor de necrosis tumoral,

- inhibidores de la histona deacetilasa, y otros bien conocidos en la técnica. En algunas modalidades, la composición pro-apoptótica comprende una superficie, tal como una perla magnética, que tiene unido a ella uno o más agentes que se unen a una porción de la superficie celular. Con respecto a esto, el agente puede ser cualquier agente como se describe en la presente invención. En una modalidad, la superficie tiene unido a ella al menos anticuerpos anti-CD3. En otra modalidad, la superficie tiene unido a ella anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Adicionalmente, un estimulador de la apoptosis puede ser un polipéptido que es capaz de aumentar o inducir la actividad apoptótica de una célula. Tales polipéptidos incluyen aquellos que regulan directamente la vía apoptótica tales como Bax, Bad, Bcl-xL, Bak, Bik, y caspasas activas así como aquellos que regulan indirectamente la vía. Otras composiciones pro-apoptóticas ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, células irradiadas (*por ejemplo* células dadoras o receptoras (allo)), antígenos diana (*por ejemplo* antígenos diana autoinmune definidos tales como proteína básica de mielina (MBP), antígenos de la célula del islote pancreático, proteína enlazadora citoplasmática 170 (CLIP-170), antígeno A del síndrome de Sjogren (SS-A/Ro), antígeno B del síndrome de Sjogren (SS-B/La), antígeno de lupus de Sjogren (SL), antígeno 70 de la esclerodermia (Scl-70)) moléculas de ácido nucleico, proteínas o péptidos, y compuestos no proteicos o no polinucleotídicos.
- Como reconocerá fácilmente el técnico con experiencia, las pruebas sobre cualquier composición pro-apoptótica usada en los métodos de la presente invención deberán llevarse a cabo de forma rutinaria en un intervalo de dosis para determinar: 1) el comportamiento de estas sustancias; y 2) la seguridad y la identificación de cualquier efecto adverso 3) las dosis óptimas para la inducción eficaz de la apoptosis en las células a eliminar. Así, las composiciones pro-apoptóticas particulares empleadas en los métodos descritos en la presente invención requerirían de una optimización individual de rutina. En una modalidad particular, la población de células restantes que se aclaró de las subpoblaciones de células reactivas indeseadas, puede administrarse después al paciente sin estimulación/activación adicional o expansión.
- En una modalidad de la presente invención, las células se exponen varias veces a composiciones pro-apoptóticas solas o en combinación con otras composiciones pro-apoptóticas. En algunos aspectos de la presente invención, puede preferirse activar/estimular y en algunos casos además expandir una población mixta de células como se describe más abajo en las secciones tituladas "Estimulación/Activación de Poblaciones Celulares" y "Expansión de Poblaciones Celulares" antes de la exposición a una o más composiciones pro-apoptóticas. En una modalidad preferida, las células restantes en la población después de la exposición a una de las composiciones pro-apoptóticas de la presente invención, se activan/estimulan y se expanden *in vitro* como se describe más abajo en las secciones tituladas "Estimulación/Activación de las Poblaciones Celulares" y "Expansión de Poblaciones Celulares". En algunas modalidades, la composición pro-apoptótica y la composición usada para activar/estimular y expandir son la misma composición. En una modalidad particular, una superficie que tiene unida a ella un agente, como los descritos en la presente invención, se usa como una composición pro-apoptótica y más aún, se usa para activar/estimular y expandir una población mixta. Con respecto a esto, ciertas células clonales en la población son inducidas a experimentar apoptosis, mientras que otras son estimuladas/activadas y proliferan en respuesta a la composición. En este contexto, una composición ilustrativa que puede usarse tanto para inducir la apoptosis en una subpoblación de células T como para estimular/activar y expandir una población mixta de células T comprende anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 co-inmovilizados sobre perlas (perlas 3x28).
- En otra modalidad de la presente invención, las células restantes después de la exposición a una o más composiciones pro-apoptóticas, adicionalmente se estimulan/activan y expanden *in vivo*. La estimulación y expansión *in vivo* de las células de la presente invención se puede llevar a cabo usando cualquier número de citocinas, tales como IL-2 e IL-4 u otros agentes descritos en la presente invención que estimulan las células.
- En una modalidad adicional de la presente invención, las células restantes después de la exposición a una o más composiciones pro-apoptóticas, adicionalmente se estimulan/activan y expanden *in vitro* utilizando las superficies y agentes unidos a ellas como se describe más abajo en las secciones tituladas "Estimulación/Activación de Poblaciones Celulares" y "Expansión de Poblaciones de Células T". La estimulación y la activación de las células restantes que no han experimentado apoptosis usando las superficies de la presente invención, pueden aumentar la policlonalidad de dichas poblaciones restantes de células T tal como se mide por la amplitud de la respuesta de la población a un antígeno dado. La restauración o el incremento de la policlonalidad pueden medirse mediante la determinación de la amplitud de la respuesta a un antígeno particular de interés, por ejemplo, midiendo el número de diferentes epítomos reconocidos por las células antígeno específicas. Esto puede llevarse a cabo usando técnicas estándar para generar y clonar células T antígeno específicas *in vitro*.
- La estimulación y la activación usando las superficies de la presente invención de las células restantes que no han experimentado apoptosis, restauran la policlonalidad a dicha población restante de células T con respecto a los genes de TCR expresados como se indica por análisis espectral. La policlonalidad de las composiciones de células T de la presente invención son como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 60/375, 733. El análisis espectral es

un método para medir el uso de genes TCR V β , V α , V γ , o V δ por un conjunto de células T y los niveles de inserción de nucleótidos durante el proceso de recombinación en el desarrollo de las células T (como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5,837,447). El análisis espectral puede usarse para medir la amplitud o estrechez del potencial de respuesta inmune de la célula T. Además, el análisis espectral puede usarse para determinar si las poblaciones clonales indeseadas específicas de las células T se han eliminado de una población mixta de células T.

La capacidad de los segmentos génicos V, D, y J de combinarse juntos aleatoriamente introduce un gran elemento de diversidad combinatoria en el repertorio de TCR. El punto preciso en el que los segmentos V, D, y J se unen puede variar, dando lugar a la diversidad local de aminoácidos en la unión. La posición exacta de nucleótidos de la unión puede diferir en hasta 10 residuos lo que resulta en una delección de nucleótidos de los extremos de segmentos génicos V, D, y J, produciendo así cambios de codón en las uniones de estos segmentos. La diversidad aumenta adicionalmente durante el proceso de reordenamiento cuando se añaden nucleótidos adicionales no codificados por cualquiera de los segmentos génicos en la unión entre los segmentos génicos unidos. (La variabilidad generada por este proceso se le llama "diversidad de la región N.") (Janeway, Travers, Walport. Immunobiology. Cuarta Ed., 98 y 150. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing. 1999).

El grado de diversidad del repertorio de células T se puede medir, en parte, mediante la evaluación de que cadenas TCR V β , V α , V γ , o V δ están siendo empleadas por las células T individuales dentro de un grupo de células T circulantes, y por el número de nucleótidos aleatorios insertados próximos al gen V β en las uniones de genes V-D-J o V-J. Generalmente, cuando el conjunto de células T circulantes contiene las células T que expresan la variedad completa de cadenas TCR V β , V α , V γ , o V δ y cuando esas cadenas individuales de región V se derivan a partir de los eventos de recombinación génica que utilizan la gama más amplia de nucleótidos insertados, el brazo de células T del sistema inmunológico tendrá su mayor potencial para reconocer el universo de antígenos potenciales. Cuando la variedad de cadenas de región V del TCR expresadas por el conjunto de células T circulantes se limita o se reduce, y cuando los TCR expresados utilizan cadenas codificadas por genes recombinados con inserciones de nucleótidos limitadas, la amplitud del potencial de la respuesta inmune se reduce correspondientemente. Las consecuencias de esto son una capacidad reducida para responder a la amplia variedad de antígenos lo que conduce a mayores riesgos de infección y cáncer.

Los métodos para determinar la apoptosis se conocen en la materia y se describen, por ejemplo, en Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., o en la patente de Estados Unidos núm. 6,312,684. Los ensayos ilustrativos para medir la apoptosis comprenden escalera del ADN, microscopía electrónica u óptica, citometría de flujo, y diferentes estuches comercialmente disponibles para la determinación de la apoptosis. En algunas modalidades, las células se observan para los cambios morfológicos, tales como condensación de la cromatina, encogimiento de la célula, aumento de la granularidad y otros indicios de apoptosis conocidos por aquellos expertos en la materia. La condensación de la cromatina puede detectarse por métodos estándar, tales como microscopía óptica de preparaciones de células teñidas. La contracción celular y la granularidad pueden detectarse fácilmente mediante la medición de las propiedades de dispersión de luz de las células (Kerr, y otros. Supra., Y Wyllie, y otros, Supra). La observación de la fragmentación sencilla o doble de la cadena de ADN en escaleras oligonucleosómicas frecuentemente es otra indicación de que se indujo la apoptosis (Arend, y otros, Am. J. Pathol, 136:593, 1990; Wyllie, y otros, J. Pathol, 142.:67, 1984). A veces, sin embargo, las células apoptóticas no presentan fragmentación bicatenaria del ADN internucleosomal (Collins, y otros, Int. J. Rad. Biol., 62:45 1992; Cohen, y otros, Biochem. J., 1992 286:331); en vez, se observarán solo roturas de una sola cadena de ADN. Las roturas de cadena sencilla pueden detectarse fácilmente usando un método de marcaje del extremo de la mella del ADN *in situ*. Este método es descrito por Wyllie, y otros (Br. J. Cancer, 67:20,1993).

En una modalidad, las células se exponen a una composición inhibidora del crecimiento como se describe en la presente invención. En algunas modalidades, las composiciones inhibidoras del crecimiento de la presente invención inhiben el crecimiento en al menos una porción sustancial de al menos una población clonal de células T de manera que cuando una población mixta de células se activa/estimula y se expande como se describe en la presente invención, las células con el crecimiento inhibido no se expanden y son eventualmente sacadas de competencia por la población mixta de células. El resultado final de esto es la eliminación efectiva de las células con el crecimiento inhibido de la población mixta de células.

Exposición a composiciones que sensibilizan las células a una estimulación/activación adicional

Alternativamente, al menos una porción sustancial de una población indeseada de células puede eliminarse primero por sensibilización de las células a una estimulación/activación adicional y después adicionalmente estimulándolas o activándolas por exposición a una superficie de la presente invención. Esta estimulación/activación adicional induce la apoptosis en las células sensibilizadas, que conduce a su eliminación de la población. Las composiciones sensibilizantes además sensibilizan a las células a los efectos de las composiciones pro-apoptóticas descritas anteriormente. Así, la

presente invención proporciona métodos para eliminar al menos una porción sustancial de una población clonal de células T indeseada a partir de una población de células inmunes por la exposición a una o más composiciones que sensibilizan las poblaciones de células indeseadas a una estimulación/activación adicional o a los efectos de pro-composiciones que comprenden poblaciones de células que ya no contienen células indeseadas, y los usos de estas.

En un aspecto de la presente solicitud, una población de células T se expone a una composición o composiciones que sensibilizan a la activación o estimulación adicional, al menos a una porción de las células, por ejemplo, células T altamente activadas previamente. En una modalidad preferida, las células sensibilizadas comprenden células T autorreactivas indeseadas. En una modalidad adicional, las células sensibilizadas comprenden células alorreactivas presentes en células madre hematopoyéticas de donantes. En aún una modalidad adicional, las células sensibilizadas comprenden células alorreactivas de un potencial receptor de trasplante de órgano.

En una modalidad, la composición de sensibilización comprende células irradiadas. En una modalidad particular, las células irradiadas son de células madre hematopoyéticas de un receptor de trasplante y las células a sensibilizar son las células madre hematopoyéticas del donante del trasplante. En otra modalidad, la composición de sensibilización comprende células irradiadas de un donante de órganos y las células a sensibilizar son células del receptor del órgano. En algunas modalidades, las células a sensibilizar son células de un receptor de órganos después del trasplante. Las células son típicamente irradiadas con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads, con mayor preferencia a aproximadamente 3300 rads. Otras células irradiadas que pueden ser útiles en la presente invención, tales como líneas celulares lifoblásticas o tumorales son típicamente irradiadas con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 6000 a 10,000 rads, con mayor preferencia a aproximadamente 8000 rads. Las células pueden tratarse además por otros medios tales como con agentes químicos (por ejemplo, etoposido, mitomicina, y similares).

Las composiciones sensibilizantes incluyen cualquier composición o combinación de composiciones que sensibilizan las células T, para la estimulación posterior de tal manera que la estimulación o la activación posterior induce la apoptosis. Las composiciones sensibilizantes de la presente invención incluyen además cualquier composición o combinación de composiciones que sensibilizan las células T, para la exposición posterior a una composición pro-apoptótica. Las composiciones sensibilizantes incluyen pero sin limitarse a anticuerpos tales como anti-CD2, anti-CD3, anti-FAS; dímeros o tetrámeros de MHC-péptido, citocinas tales como IL-2, TRAIL, compuestos tales como rolipram, doxorubicina, clorambucil y fludarabina. Las composiciones sensibilizantes incluyen además ligando FAS y los ligandos naturales para CD2 y CD3. Las composiciones sensibilizantes incluyen además inhibidores de bc1-2, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos núm. 6,277,844, inhibidores de la topoisomerasa, tales como etoposido, CPT-11 y topotecan, y otros, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos núm. 5,834,012. Otras composiciones sensibilizantes ilustrativas incluyen agentes de unión a la enzima de conversión de la interleucina-113 (ICE) que induce apoptosis, tal como proteína IpaB de Shigella descrita en la patente de Estados Unidos núm. 5,972,899, o compuestos descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 6,350,741, 6,294,546 y 6,329,365.

Las composiciones sensibilizantes comprenden autoantígenos. Los autoantígenos pueden definirse antígenos diana autoinmunes, por ejemplo, antígenos diana autoinmunes definidos por ejemplo, en esclerosis múltiple, el antígeno diana identificado como proteína básica de mielina (MBP) MBP 84-102, o MBP 143-168; antígenos de la célula del islote pancreático; en uveítis, el Antígeno S; o en artritis reumatoide, colágeno tipo II u otros tipos; en SLE, proteína enlazadora citoplasmática -170 (CLIP-170); antígeno A del síndrome de Sjogren (SS-A/Ro), antígeno B del síndrome de Sjogren (SS-B/La), antígeno del lupus del síndrome de Sjogren (SL); antígeno 70 de esclerodermia 70 (Scl-70); en la enfermedad de Grave, receptor de tiroides; en Miastenia gravis, receptor de acetilcolina, moléculas de ácido nucleico, proteínas o péptidos, y compuestos no-proteicos o no-polinucleotídicos. Autoantígenos comprenden además mezcla de péptidos eluidos de moléculas MHC conocidas por estar asociadas con la autoinmunidad, por ejemplo, moléculas HLA-DQ y -DR que confieren susceptibilidad a varias enfermedades autoinmunitarias comunes, tales como diabetes tipo 1, artritis reumatoide y esclerosis múltiple, o moléculas HLA-B27 conocidas por conferir susceptibilidad a la artritis reactiva y espondilitis anquilosante. Los autoantígenos pueden ser además péptidos sintetizados de los que se predice su unión a moléculas de MHC asociadas a enfermedades autoinmunes.

Las composiciones sensibilizantes pueden usarse para la eliminación selectiva de al menos una porción sustancial de una población de células T que expresan un gen V β , V α , V γ o V δ específico. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para un gen V β , V α , V γ o V δ en particular puede usarse para sensibilizar específicamente las células T de acuerdo con los métodos de la presente invención. Alternativamente, las células T que expresan un gen de interés particular V β , V α , V γ o V δ pueden seleccionarse negativamente, eliminando así al menos una porción sustancial de los mismos de una población.

En modalidades adicionales, una o más composiciones de sensibilización se usan de forma simultánea y durante tiempos suficientes para inducir la sensibilización deseada.

- 5 La amplia evidencia a partir del desarrollo de vacunas sugiere que tanto los péptidos sintéticos como proteínas derivadas de ADN recombinantes son eficaces para provocar una respuesta inmune en los seres humanos. Estos estudios proporcionan además una guía del intervalo de dosis eficaz para la inmunización (Zajoc, B.A., D.J. West, W.J. McAleer and E.M. Scolnick, Overview of clinical studies with Hepatitis B vaccine made by recombinant DNA, J. Infect. 13:(Suppl A)39-45 (1986). Yamamoto, S., T. Kuroki, K. Kurai and S. Iino, Comparison of results for phase I studies with recombinant and plasma-derived hepatitis B vaccines, and controlled study comparing intramuscular and subcutaneous injections of recombinant hepatitis B vaccine, J. Infect. 13:(Suppl A)53-60 (1986). Francis, D.P. y otros, The prevention of Hepatitis B with vaccine, Ann. Int. Med. 97:362-366 (1982). Putney y otros, Features of HIV envelope and development of a subunit vaccine, AIDS Vaccine Research and Clinical Trials, S. Putney y B. Bolognesi, eds. (Nueva York: Dekker) págs. 3-62 (1990). Steven, V.C. y W.R. Jones, Vaccines to prevent pregnancy, New Generation Vaccines, G.C. Woodrow y M.M. Levine, eds. (Nueva York: Dekker) págs. 879-900 (1990). Herrington y otros, Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against Plasmodium Falciparum sporozoites, Nature, 328:257-259 (1987)).

20 En una modalidad, la inmunización (es decir, la sensibilización *in vivo*) con un agente que sensibiliza a las células a una estimulación/activación adicional o exposición a una composición pro-apoptótica, es seguido después por un periodo de espera durante el cual el agente activa el subconjunto de células que portan receptores reactivos, tales como las células T que portan TCR reactivos, haciendo que expresen los receptores de citocinas, tales como el receptor de IL-2. Por ejemplo, este proceso inducirá receptores de IL-2 sólo en las células T que se estimularon antigénicamente. Basados en estudios *in vitro* de células T tanto humanas como de ratón, para expresar un número significativo de receptores de IL-2 se requieren entre aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas después de la exposición al antígeno, y se requieren

25 aproximadamente 72 horas para expresar números óptimos de receptores de IL-2 en la mayoría de las células T. Así, el periodo de espera puede ser tan corto como aproximadamente 12 horas o tan largo como aproximadamente 72 horas, y en el caso de diversos estados de enfermedad, debido a la capacidad de respuesta inmune retardada, este periodo puede ser tan largo como 120 horas, haciéndose cada vez más óptimo hacia el extremo superior de este intervalo.

30 En una modalidad, la IL-2, u otras citocinas adecuadas, tales como IL-4, se administran para inducir la apoptosis en las células activadas como se describió anteriormente. La administración de IL-2 a humanos se ha estudiado bien en pacientes con cáncer, y se han evaluado varias dosis (Loize, M.T., L.W. Frana, S.O. Sharrow, R.J. Robb and S.A. Rosenberg, In vivo administration of purified human interleukin 2. I. Half-life and immunologic effects of the Jurkat cell line-derived interleukin 2. J. Immunol. 134:157-166 (1985). Lotze, J.T., Y.L. Malory, S.E. Ettinghausen, A.A. Rayner, S.O. Sharrow, C.A.Y. Seipp, M.C. Custer y S.A. Rosenberg, In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half-life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2. J. Immunol. 135:2865-2875 (1985). Donahue, J.H. y S.A. Rosenberg, The fate of interleukin-2 after in vivo administration, J. Immunol. 130:2203-2208 (1983). Beldegrun, A., M.M. Muul y S.A. Rosenberg, Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and antitumor activity, Cancer Research 48:206-214 (1988). Rosenberg, S.A., M.T. Lotze, L.M. Muul, S. Leitman, A.E. Chang, S.E. Ettinghausen, Y.L. Malory, J.M. Skibber, E. Shiloni, J.T. Vetto, C.A. Seipp, C. Simpson y C.M. Reichert, Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer, New Eng. J. Med. 313:1485-1492 (1985).). Los datos indican que la IL-2 debe administrarse I.V., como una dosis de bolo frecuente o como una infusión continua. Las dosis han sido previamente establecidas en el intervalo entre aproximadamente 300 a aproximadamente 3000 unidades/kg/hora de infusión continua, o

45 de 104 a 106 unidades/kg de bolo I.V.

La población de células puede exponerse a una o más composiciones sensibilizantes *in vitro*. Como el técnico con experiencia reconocerá fácilmente, las pruebas en cualquier composición sensibilizante usada en los métodos tendrían que llevarse a cabo de forma rutinaria en un intervalo de dosis para determinar: 1) el comportamiento farmacocinético de estas sustancias; y 2) la seguridad y la identificación de cualquier efecto adverso 3) las dosis óptimas para la inducción efectiva de la apoptosis en las células a eliminar. Así, las composiciones de sensibilización particulares empleadas en los métodos descritos en la presente invención requerirían de una optimización individual de rutina.

55 *Estimulación de células sensibilizadas para inducir la apoptosis de las células a eliminar de una población mixta de células.*

En un aspecto, una población de células inmunes que comprende células sensibilizadas como se describe anteriormente se activa adicionalmente o se estimula para inducir la apoptosis tal como se describe más abajo en la sección titulada "Estimulación/Activación de Poblaciones Celulares", eliminando así las células T sensibilizadas, de la población mixta de

células. Al mismo tiempo, las células deseadas que quedan, *por ejemplo*, aquellas células que no son sensibilizadas a experimentar apoptosis, se activan y se estimulan a expandirse, lo que resulta así en una población de células activadas a partir de las cuales al menos una porción sustancial de las subpoblaciones indeseadas de T han sido eliminadas. Como se mencionó anteriormente, la estimulación/activación como se describe en la presente invención puede llevarse a cabo en las células restantes después de la exposición de una población mixta de células directamente a composiciones pro-apoptóticas. Además, la estimulación posterior y la activación proporcionada por la presente invención restauran la policlonalidad a la población de células T con respecto a los genes de TCR expresados como se indica por análisis espectral.

En una modalidad, las células sensibilizadas se estimulan/activan varias veces como se describe más abajo con o sin composición sensibilizante adicional, tantas veces como sea necesario para eliminar al menos una porción sustancial de las células indeseadas. Por ejemplo, en el contexto de una enfermedad autoinmune, la presente invención proporciona métodos para estimular a las células una segunda o más veces en la presencia de antígeno (*es decir*, la composición de sensibilización) después de la ronda inicial de estimulación/activación. Del mismo modo, en el contexto de trasplante de células madre hematopoyéticas, la presente solicitud proporciona métodos para estimular las células del donante de células madre hematopoyéticas una segunda o más veces, o tantas veces como sea necesario para eliminar al menos una porción sustancial de las células indeseadas, en presencia de células irradiadas de un tallo receptor de trasplante de células hematopoyéticas. En el contexto de trasplante de órganos, la presente solicitud proporciona métodos para estimular a las células del receptor del órgano una segunda o más veces, o tantas veces como sea necesario para eliminar al menos una porción sustancial de las células indeseadas, si es necesario en presencia de células irradiadas del donante de órganos. En una modalidad, los métodos se llevan a cabo en células de un paciente (*por ejemplo*, células huésped) después del trasplante con el fin de eliminar las células indeseadas. En algunas modalidades, puede no ser necesario eliminar todas las células indeseadas, por ejemplo, en el contexto del trasplante de células madre hematopoyéticas para algunos tipos de cáncer, puede desearse el efecto injerto contra células leucémicas.

En algunos aspectos, puede preferirse estimular/activar y en algunos casos expandir una población mixta de células como se describe más abajo en las secciones tituladas "Estimulación/Activación de Poblaciones Celulares" y "Expansión de Poblaciones Celulares" antes de la exposición a uno o más agentes que sensibilizan las células a una estimulación/activación adicional y posterior estimulación.

En aspectos adicionales, las células se sensibilizan y después se exponen a una composición pro-apoptótica, eliminando así al menos una porción sustancial de células que se sensibilizaron a los efectos de la composición pro-apoptótica. Las células restantes en la población pueden después estimularse/activarse adicionalmente y expandirse como se describe más abajo.

En una modalidad, las células se exponen a una composición de inhibición del crecimiento como se describe en la presente invención. En algunas modalidades, las composiciones inhibitorias del crecimiento inhiben el crecimiento en al menos una parte sustancial de al menos una población clonal de células T de manera que cuando una población mixta de células se activa/estimula y se expande como se describe en la presente invención, las células con crecimiento inhibido no se expanden y eventualmente son sacadas de la competencia por la población mixta de células. El resultado final de esto es la eliminación efectiva de las células con crecimiento inhibido de la población mixta de células.

Generación de una Población Pura de Células T CD3⁺CD28⁺

Una población pura de células T CD3⁺CD28⁺ puede generarse por concentración magnética, selección, y estimulación de una población mixta de células T con una composición capaz de estimular tanto moléculas CD3 como CD28 en la superficie de una célula T. La selección y estimulación tanto de moléculas CD3 como CD28 en la superficie de una célula resulta en la activación y proliferación de este subconjunto de células. Por el contrario, en las condiciones descritas en la presente invención, la exposición de una célula T CD3⁺ CD28⁺ a una composición capaz de seleccionar y estimular tanto las moléculas de superficie CD3 como CD28 sería insuficiente para inducir tanto la activación como la expansión de esta población de células T. Además, el acortamiento del tiempo de incubación con perlas CD3/CD28 como se describe en la presente invención, favorece la selección de las células CD3⁺ CD28⁺ a expensas de las células CD3⁺ CD28⁻ (*por ejemplo*, una selección de 15 minutos a 1 rpm a temperatura ambiente, seguido de concentración magnética deja a muchas o a la mayoría de las células CD3⁺CD28⁻ detrás). La activación del TCR lo mismo por un antígeno específico o por una molécula capaz de estimular la molécula de superficie CD3, por ejemplo un anticuerpo anti-CD3, se considera insuficiente para inducir la expansión y la secreción de linfocinas a menos que se suplementen por medio de señales co-estimuladoras, *es decir*, la estimulación específica de la molécula CD28. De hecho, en ausencia de co-estimulación, estas células T pueden adquirir un estado de falta de capacidad de respuesta o energía.

Una población de células T CD3⁺ CD28⁺ sustancialmente pura contiene menos que 10% de células T CD3⁺ CD28⁻. En algunas modalidades, una población de células T CD3⁺ CD28⁺ sustancialmente pura contiene menos que 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, o 0.1% de células T CD3⁺CD28⁻.

Así, los métodos de la presente solicitud, *por ejemplo*, la estimulación y selección de una población mixta de células T que utiliza una composición capaz de activar CD3 y estimular CD28, resultaría en la generación de una población sustancialmente pura de células T CD3⁺ CD28⁺.

Esta población sustancialmente pura de células T CD3⁺ CD28⁺ puede usarse para tratar la GVHD aguda o crónica. Una población de células T CD3⁺ CD28⁺ sustancialmente pura puede usarse para tratar enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes dependiente de insulina, enfermedad de Addison, enfermedad celiaca, síndrome de fatiga crónica, colitis, enfermedad de Crohn, fibromialgia, lupus, soriasis, síndrome de Sjogren, hipertiroidismo/enfermedad de Graves, hipotiroidismo/enfermedad de Hashimoto, diabetes dependiente de insulina (tipo 1), Miastenia Gravis, endometriosis, esclerodermia, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Wegener y fiebre reumática. En una modalidad adicional, las células pueden usarse para tratar la autoinmunidad asociada con la leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL). Una población mixta de células inmunes podría removerse de un donante y estas células estimularse con una composición capaz de estimular las moléculas CD3 y CD28. Sin querer estar atados a la teoría, se postula que esta estimulación resulta en la activación específica y la expansión de células T CD3⁺CD28⁺, y resulta en la anergia de las células T que carecen de la expresión de la molécula co-estimuladora, CD28. Una vez que se ha generado la población pura de células T CD3⁺ CD28⁺, estas células pueden después infundirse para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, LGL, o GVHD.

ESTIMULACIÓN/ACTIVACIÓN DE POBLACIONES CELULARES

Las células T estimuladas y activadas se generan por ligación de la porción de la superficie celular que induce la activación. En algunas modalidades, las células T estimuladas y activadas se generan activando una población de células T solamente a través del acoplamiento del TCR, por ejemplo usando anticuerpos anti-CD o ligandos naturales para el TCR. En algunas modalidades, las células T estimuladas y activadas se generan activando una población de células T y estimulando una molécula accesoria en la superficie de las células T con un ligando que se une a la molécula accesoria, como se describe, por ejemplo, en las solicitudes de patente de Estados Unidos números 08/253,694, 08/435,816, 08/592,711, 09/183,055, 09/350,202, y 09/252,150, y las patentes números 6,352,694, 5,858,358 y 5,883,223. En el contexto de las células sensibilizadas descritas anteriormente, activar dicha población de células T sensibilizadas y estimular una molécula accesoria en la superficie de dichas células T sensibilizadas con un ligando que se une a la molécula accesoria induce la apoptosis y posterior eliminación de las células.

Generalmente, la activación de la célula T de células puede realizarse por la ligación de la porción de la superficie celular, tal como estimulando el complejo receptor de célula T (TCR)/CD3 o la proteína superficial CD2. Un número de anticuerpos monoclonales CD3 anti-humanos se encuentran comercialmente disponibles, los ejemplos son, clon BC3 (XR-CD3; Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA), OKT3, preparado a partir de las células de hibridoma obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo, y anticuerpo monoclonal G19-4. Igualmente, las formas estimulantes de los anticuerpos anti-CD2 se conocen y están disponibles. La estimulación a través de CD2 con anticuerpos anti-CD2 es típicamente realizada usando una combinación de al menos dos anticuerpos anti-CD2 diferentes. Las combinaciones estimulantes de los anticuerpos anti-CD2 que se han descrito incluyen las siguientes: el anticuerpo T11.3 en combinación con el anticuerpo T11.1 o T11.2 (Meuer y otros, Cell 36:897-906, 1984), y el anticuerpo 9.6 (que reconoce el mismo epítipo que T11.1) en combinación con el anticuerpo 9-1 (Yang y otros, J. Immunol. 137:1097-1100, 1986). Otros anticuerpos que se unen a los mismos epítopos como cualquiera de los anticuerpos anteriormente descritos pueden usarse también. Los anticuerpos adicionales, o combinaciones de anticuerpos, pueden prepararse e identificarse por técnicas estándar. La estimulación puede alcanzarse además a través del contacto con superantígenos (*por ejemplo*, enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA), enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB), Toxina 1 del síndrome de Choque Tóxico (TSST-1)), endotoxina, o a través de una variedad de mitógenos, que incluyen pero sin limitarse a, fitohemaglutinina (PHA), acetato de forbol miristato (PMA) e ionomicina, lipopolisacárido (LPS), mitógeno de célula T, e IL-2.

Para activar adicionalmente una población de células T, una molécula co-estimuladora o accesoria en la superficie de las células T, tales como CD28, se estimula con un ligando que se une a la molécula accesoria. En consecuencia, el experto en la técnica reconocerá que cualquier agente, que incluye un anticuerpo anti-CD28 o fragmento de este capaz de entrecruzar la molécula de CD28, o un ligando natural para CD28 puede usarse para estimular las células T. Los anticuerpos anti-CD28 o fragmentos de estos ilustrativos útiles en el contexto de la presente solicitud incluyen el anticuerpo monoclonal 9.3 (IgG2_a)

(Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), anticuerpo monoclonal KOLT-2 (IgG1), 15E8 (IgG1), 248.23.2 (IgM), clon B-T3 (XR-CD28; Diaclone, Besançon, Francia) y EX5.3D10 (IgG2_a) (ATCC HB11373). Los ligandos naturales ilustrativos incluyen la familia B7 de proteínas, tales como B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) (Freedman y otros, J. Immunol. 137:3260-3267, 1987; Freeman y otros, J. Immunol. 143:2714-2722, 1989; Freeman y otros, J. Exp. Med. 174:625-631, 1991; Freeman y otros, Science 262:909-911, 1993; Azuma y otros, Nature 366:76-79, 1993; Freeman y otros, J. Exp. Med. 178:2185-2192, 1993).

Otras moléculas accesorias ilustrativas en la superficie de las células T que pueden ser estimuladas con un ligando que se une a la molécula accesoria incluyen, pero sin limitarse a, CD54, LFA-1, ICOS, y CD40.

Adicionalmente, los homólogos de unión de un ligando natural, ya sea nativos o sintetizados mediante técnicas recombinantes o químicas, pueden usarse además de conformidad con la presente solicitud. Otros agentes pueden incluir ligandos naturales y sintéticos. Los agentes pueden incluir, pero sin limitarse a, otros anticuerpos o fragmentos de los mismos, factor de crecimiento, citocina, quimocina, receptor soluble, esteroide, hormona, mitógeno, tal como PHA, u otros superantígenos.

Como se describió anteriormente, la posterior estimulación y activación de las células restantes que no experimentaron la apoptosis o no se sensibilizaron para someterlas a la apoptosis, restaura la policlonalidad de dicha población restante de células T con respecto a los genes TCR expresados como se indicó por análisis espectral tipo.

EXPANSIÓN DE POBLACIONES CELULARES

Generalmente, la presente solicitud proporciona la expansión de la población celular que queda después de la exposición de la población a una composición pro-apoptótica o una composición sensibilizante y cualquier inducción posterior de apoptosis en subpoblaciones de células indeseadas, preferentemente células T autorreactivas o alorreactivas indeseadas. En una modalidad, las células T restantes pueden ser estimuladas por un solo agente. En otra modalidad, las células T restantes se estimulan con dos o más agentes, uno que induce una señal primaria y agentes adicionales que inducen una o más señales co-estimuladoras. Los ligandos útiles para estimular una sola señal o estimular una señal primaria y una molécula accesoria que estimula una segunda señal pueden usarse en forma soluble, unidos a la superficie de una célula, o inmovilizados en una superficie como se describe en la presente invención. Un ligando o agente unido a una superficie sirve como célula presentadora de antígeno "sustituta" (APC). En una modalidad preferida tanto los agentes primarios como los secundarios se co-inmovilizan sobre una superficie. En una modalidad, la molécula que proporciona la señal de activación primaria, tal como un ligando CD3, y la molécula co-estimuladora, tal como un ligando CD28, se acoplan a la misma superficie, por ejemplo, una partícula. Más aún, como se señaló anteriormente, una, dos, o más moléculas estimuladoras pueden usarse en la misma o diferentes superficies.

La población celular puede estimularse como se describe en la presente invención, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3 o un anticuerpo anti-CD28 inmovilizado sobre una superficie, o por contacto con un activador de la proteína cinasa C (*por ejemplo*, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la co-estimulación de una molécula accesoria sobre la superficie de las células T, se usa un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de células CD4⁺ puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, bajo condiciones adecuadas para estimular la proliferación de las células T. Alternativamente, una población de células puede ponerse en contacto con PMA e ionomicina. Igualmente, para estimular la proliferación de células T CD8⁺, puede usarse un anticuerpo anti-CD3 y el anticuerpo anti-CD28 B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, Francia) al igual que otros métodos comúnmente conocidos en la materia (Berg y otros, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen y otros, J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland y otros, 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 por diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando están acoplados a una superficie, los agentes pueden estar acoplados a la misma superficie (*es decir*, en formación "cis") o a superficies separadas (*es decir*, en formación "trans"). Alternativamente, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente puede estar en solución. En una modalidad, el agente que proporciona la señal co-estimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En algunas modalidades, ambos agentes pueden estar en solución. En otra modalidad, los agentes pueden estar en forma soluble, y luego entrecruzados a una superficie, tal como una célula que expresa receptores Fc o Sc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. En una modalidad preferida, los dos agentes están inmovilizados sobre una superficie esférica o semi-esférica, los ejemplos prototípicos son perlas o células, lo mismo sobre la misma perla, *es decir*, "cis", que en perlas separadas, *es decir*, "trans". 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 están co-inmovilizados a la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En una modalidad, se usa una relación 1:1 de cada uno de los anticuerpos unidos a las perlas para la expansión de células T y el crecimiento de células T. En algunos aspectos de la presente invención, se usa una relación de anticuerpos anti-CD3:anti-CD28 (CD3:CD28) unidos a las perlas de tal manera que se observa un aumento de la expansión de células T en comparación con la expansión observada al usar una relación de 1:1. En una modalidad particular se observa un aumento de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada al usar una relación de 1:1. En una modalidad, la relación del anticuerpo anti-CD3 :anti-CD28 (CD3 :CD28) unidos a las perlas está en el intervalo de aproximadamente 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre estos. En algunas modalidades, la relación de CD3:CD28 es al menos aproximadamente 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, o 1:1. En un aspecto, a las partículas se une más anticuerpo anti-CD28 que anticuerpo anti-CD3, es decir la relación CD3:CD28 es menor que uno. En algunas modalidades, la relación del anticuerpo anti-CD28 al anticuerpo anti CD3 unidos a las perlas es mayor que 2:1. En una modalidad particular, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:200. En una modalidad particular, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:150. En una modalidad particular, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:100. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:75. En una modalidad adicional, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:50. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:45. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:40. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:35. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:30. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:25. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:20. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:15. En una modalidad preferida, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:10. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:5. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:4. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:3. En aún otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 3:1.

Las relaciones de las partículas con respecto a las células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero entre estos pueden usarse para estimular las células T u otras células dianas. Como pueden apreciar fácilmente expertos en la materia, la relación de las partículas con respecto a las células puede depender del tamaño de partícula con relación a la célula diana. Por ejemplo, las perlas de tamaño pequeño pueden solamente unirse a unas pocas células, mientras que las perlas más grandes pueden unirse a muchas. En algunas modalidades la relación de células a partículas está en el intervalo de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero entre estos y en otras modalidades la relación comprende 1:50 a 50:1 y cualquier valor entero entre estos. En otra modalidad, la relación de células a partículas está en el intervalo de 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero entre estos, y además pueden usarse para estimular las células T. La relación de las partículas acopladas a anti-CD3 y anti-CD28 con respecto a las células T que resulta en la estimulación de células T puede variar como se señaló anteriormente, sin embargo algunos valores preferidos incluyen al menos 1:150, 1:125, 1:100, 1:75, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2.5, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, y 15:1, con una relación preferida de al menos 1:1 partículas por célula T. En una modalidad particular, la relación preferida de partículas a células es 1:5 o 1:10. En una modalidad, se usa una relación de partículas a células de 1:1 o menos.

En otras modalidades, la relación de partículas a células puede variar dependiendo del día de la estimulación. Por ejemplo, en una modalidad, la relación de partículas a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células cada día o en días alternos después de este por 10 días, a relaciones finales de 1:1 a 1:10 (basado en los conteos de células en el día de la adición). En otra modalidad, la relación de partículas a células es al menos aproximadamente 1:2.5 el primer día y las partículas adicionales se añaden a las células el día 5 a aproximadamente 1:10, 1:25, 1:50 o 1:100, el día 7 a 1:10, 1:25, 1:50, o 1:100 y el día 9 a 1:10, 1:25, 1:50, o 1:100. En una modalidad particular, la relación de partículas a células es 1:1 el primer día de la estimulación y se ajusta a 1:5 el tercer y quinto días de estimulación. En otra modalidad, las partículas se añaden diariamente o en días alternos hasta una relación final de 1:1 el primer día, y 1:5 el tercer y quinto días de estimulación. En otra modalidad, la relación de partículas a células es 2:1 el primer día de la estimulación y se ajusta a 1:10 el tercer y quinto días de estimulación. En otra modalidad, las partículas se añaden diariamente o en días alternos hasta una relación final de 1:1 el primer día, y 1:10 el tercer y quinto días de estimulación. Una persona experta en la materia apreciará que una variedad de otras relaciones puede ser adecuada para usar en la presente solicitud. Particularmente, las relaciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de la célula.

Un aspecto de la presente solicitud se deriva del descubrimiento sorprendente de que el uso de diferentes relaciones perla:célula puede conducir a diferentes resultados con respecto a la expansión de células T antígeno específicas. En

particular, las relaciones perla:célula se pueden variar para expandir o suprimir selectivamente células T (de memoria) antígeno específicas. En una modalidad, la relación perla:célula usada en particular suprime de manera selectiva las células T antígeno específicas. Específicamente, relaciones perla:célula altas, tales como aproximadamente 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, y superiores, inducen la supresión de células T antígeno específicas. Sin estar atados por la teoría, se cree que las células T antígeno específicas son más sensibles a una estimulación adicional. La estimulación con relaciones perla:célula altas proporciona una alta concentración de anticuerpo estimulante, lo que conduce a la sobre-estimulación de las células T antígeno específicas, lo que causa su muerte, por apoptosis o por otros mecanismos. Así, con respecto a esto, las composiciones de perlas descritas en la presente invención funcionan como una composición pro-apoptótica. Además, con respecto a esto, como podrá apreciar el técnico con experiencia, en algunas modalidades, la misma composición usada como composición pro-apoptótica (*por ejemplo*, una superficie que tiene unido a ella un agente que estimula una porción de la superficie celular, tales como las composiciones de perlas descritas en la presente invención) se usa para expandir la población mixta de células restante para su uso en cualquier variedad de contextos inmunoterapéuticos tal como se describe en la presente. El uso de relaciones perla:célula inferiores proporciona una señal de estimulación a las células T antígeno específicas que no las sobre-estimulan, sino más bien inducen una proliferación rápida de estas células. En una modalidad adicional, la relación perla:célula usada en particular expande de manera selectiva las células T antígeno específicas. El técnico con experiencia apreciará fácilmente que se puede usar cualquier relación siempre y cuando se produzca la expansión o supresión deseada. Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos en la presente invención pueden usarse para expandir poblaciones específicas de células T, o para suprimir poblaciones específicas de células T, para su uso en cualquier variedad de contextos inmunoterapéuticos descritos en la presente.

El uso de algunas metodologías puede ser ventajoso para mantener una estimulación a largo plazo de una población de células T después de la activación y estimulación iniciales, mediante la separación de las células T del estímulo después de un período de aproximadamente 7 a aproximadamente 14 días. La velocidad de proliferación de las células T se controla periódicamente (*por ejemplo*, todos los días), por ejemplo, examinando el tamaño o midiendo el volumen de las células T, tal como con un contador Coulter. Con respecto a esto, una célula T en reposo tiene un diámetro medio de aproximadamente 6.8 micras, y tras la activación y estimulación iniciales, en presencia del ligando estimulante, el diámetro medio de las células T se incrementará a más de 12 micras hacia el día 4 y comenzará a disminuir hacia el día 6 aproximadamente. Cuando el diámetro medio de las células T se reduce a aproximadamente 8 micras, las células T pueden estar reactivadas y re-estimuladas para inducir aún más proliferación de las células T. Alternativamente, la velocidad de proliferación de las células T y el tiempo para la re-estimulación de las células T pueden controlarse por el ensayo de la presencia de moléculas en la superficie celular, tales como, CD154, CD54, CD25, CD137, CD134, que se inducen en las células T activadas.

Para inducir la estimulación a largo plazo de una población de células T CD4⁺ y/o CD8⁺, puede ser necesario reactivar y re-estimular las células T con un agente estimulante tal como un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28 (*por ejemplo*, B-T3, XR-CD28 (Diacclone, Besançon, Francia)) varias veces para producir una población con un aumento en el número de células CD4⁺ o CD8⁺ de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 veces con respecto a la población original de células T. Por ejemplo, en una modalidad, las células T son estimuladas 2-3 veces como se describe. En modalidades adicionales, las células T son estimuladas 4 o 5 veces como se describe. Usando la presente metodología, es posible lograr números de células T que han aumentado su policlonalidad de aproximadamente 100 a aproximadamente 100,000 veces en comparación con la población antes de la estimulación. Además, las células T expandidas por el método de la presente solicitud secretan niveles sustanciales de citocinas (*por ejemplo*, IL-2, IFN- γ , IL-4, GM-CSF y TNF- α) hacia los sobrenadantes del cultivo. Por ejemplo, en comparación con la estimulación con IL-2, las células T CD4⁺ expandidas mediante el uso de la co-estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 secretan altos niveles de GM-CSF y TNF- α hacia el medio de cultivo. Estas citocinas pueden purificarse a partir de los sobrenadantes del cultivo o los sobrenadantes pueden usarse directamente para mantener las células en cultivo. Igualmente, las células T expandidas mediante el método de la presente solicitud, junto con el sobrenadante y las citocinas del cultivo pueden administrarse para sostener el crecimiento de células *in vivo*.

En una modalidad, la estimulación de células T se lleva a cabo, por ejemplo, con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 co-inmovilizados sobre perlas (perlas 3x28), por un período de tiempo suficiente para que las células regresen a un estado de reposo (baja o ninguna proliferación) (aproximadamente 8-14 días después de la estimulación inicial). Después, la señal de estimulación se elimina de las células, y las células se lavan y se infunden de nuevo al paciente. Al final de la fase de estimulación las células se vuelven "super-inducibles" por los métodos de la presente solicitud, como se demuestra por su capacidad para responder a los antígenos y la capacidad de estas células para demostrar un fenotipo similar al de memoria, como se evidencia en los ejemplos. En consecuencia, tras la re-estimulación exógena o mediante un antígeno *in vivo* después de la infusión, las células T activadas demuestran una respuesta robusta caracterizada por propiedades fenotípicas únicas, tales como la expresión sostenida de CD154, el aumento de la producción de citocinas, etc.

En modalidades adicionales, las células, tales como las células T se combinan con perlas recubiertas o conjugadas con el agente, posteriormente las perlas y las células se separan, y después las células se cultivan. En una modalidad alternativa, antes del cultivo, las perlas recubiertas o conjugadas con el agente y las células no se separan sino que se cultivan juntas. En una modalidad adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, lo que resulta en ligación de porciones de la superficie celular, induciendo así la estimulación de las células y/o la polarización de la señal de activación.

A modo de ejemplo, cuando las células T son la población de células diana, las porciones de la superficie celular se pueden ligar al permitir que las perlas paramagnéticas, a las que están unidos los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (perlas 3x28), se pongan en contacto con las células T preparadas. En una modalidad las células (por ejemplo, 10^4 a 10^9 células T) y perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas CD3/CD28 T DYNABEADS® M-450 a una relación de 1:1) se combinan en un tampón, preferentemente PBS (sin cationes divalentes tales como, calcio y magnesio). Una vez más, los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente que puede usarse cualquier concentración de células. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solamente 0.01% de la muestra o la célula diana puede comprender toda la muestra (es decir, 100%). En consecuencia, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente solicitud. En algunas modalidades, se puede desear disminuir significativamente el volumen en el que las partículas y las células se mezclan (es decir, aumentar la concentración de las células), para asegurar un contacto máximo de células y partículas. Por ejemplo, en una modalidad, se usa una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/ml. En otra modalidad, se usan más de 100 millones de células/ml. En una modalidad adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 millones de células/ml. En aún otra modalidad, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95, o 100 millones de células/ml. En modalidades adicionales pueden usarse concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede resultar en un aumento del rendimiento celular, activación celular, y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de las células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, tales como células T CD28 negativas. Tales poblaciones de células pueden tener un valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En una modalidad relacionada, puede desearse usar concentraciones inferiores de células. Al diluir significativamente la mezcla de células T y de partículas, se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona las células que expresan grandes cantidades de los antígenos deseados que se unen a las partículas. Por ejemplo, las células T CD4+ expresan altos niveles de CD28 y son capturadas y estimuladas de manera más eficiente que las células T CD8+ en concentraciones diluidas. En una modalidad, la concentración de células usada es aproximadamente 5×10^6 /ml. En otras modalidades, la concentración usada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /ml a aproximadamente 1×10^6 /ml, y cualquier valor entero entre estos.

El tampón en el que las células están suspendidas puede ser cualquiera que sea adecuado para el tipo particular de célula. Cuando se usan ciertos tipos de células el tampón puede contener otros componentes, *por ejemplo*, 1-5% de suero, necesario para mantener la integridad celular durante el proceso. En otra modalidad, las células y las perlas se pueden combinar en medios de cultivo celular. Las células y las perlas pueden mezclarse, *por ejemplo*, por rotación, agitación o cualquier método de mezclado, durante un período de tiempo en el intervalo de un minuto a varias horas. Después, el contenedor de las perlas y las células se concentra mediante una fuerza, tal como colocándolo en un campo magnético. Las células no unidas y los medios se eliminan y las células unidas a las perlas u otra superficie se lavan, *por ejemplo*, al bombear a través de una bomba peristáltica, y después se re-suspenden en los medios adecuados para el cultivo celular.

En una modalidad, la mezcla puede cultivarse por 30 minutos a varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero de hora o minuto entre estos. En otra modalidad, la mezcla puede cultivarse durante 21 días. En una modalidad de la invención las perlas y las células T se cultivan juntas durante aproximadamente ocho días. En otra modalidad, las perlas y las células T se cultivan juntas durante 2-3 días. Como se describió anteriormente, pueden desearse varios ciclos de estimulación de tal manera que el tiempo de cultivo de las células T puede ser de 60 días o más. Las condiciones adecuadas para el cultivo de células T incluye un medio adecuado (*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 fetal bovino o humano) o interleucina-2 (IL-2), insulina, u otros aditivos para el crecimiento de las células, conocidos por el técnico con experiencia. El medio puede incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20, con adición de aminoácidos y vitaminas, tanto libre de suero o suplementado con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de las células T. Los antibióticos, *por ejemplo*, penicilina y estreptomycin, se incluyen solamente en cultivos experimentales, no en cultivos de células que van a infundirse a un sujeto.

Las células diana se mantienen bajo condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, temperatura (*por ejemplo*, 37°C) y atmósfera (*por ejemplo*, aire más 5% CO₂) adecuadas.

En una modalidad las relaciones perla:célula pueden ajustarse para obtener un fenotipo deseado de células T. En una modalidad particular, las relaciones perla:célula pueden variarse para expandir o suprimir de manera selectiva las células T (de memoria) antígeno específicas. En una modalidad, la relación perla:célula usada en particular suprime de manera selectiva las células T antígeno específicas. En una modalidad adicional, la relación perla:célula usada en particular expande de manera selectiva las células T antígeno específicas. El técnico con experiencia apreciará fácilmente que puede usarse cualquier relación siempre y cuando se produzca la expansión o supresión deseada de las células T antígeno específicas. Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos en la presente invención pueden usarse para expandir poblaciones específicas de células T, o para suprimir poblaciones específicas de células T, para su uso en cualquier variedad de contextos inmunoterapéuticos descritos en la presente.

En otra modalidad, el tiempo de exposición a los agentes estimulantes tales como perlas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 (*es decir*, 3x28) puede modificarse o ajustarse de tal manera que se obtenga un fenotipo deseado de células T. Alternativamente, una población deseada de células T puede seleccionarse mediante cualquier técnica de selección, antes de la estimulación. Se puede desear una mayor población de células T cooperadoras (T_H), típicamente CD4⁺ en contraposición con células T citotóxicas o reguladoras CD8⁺, ya que una expansión de células T_H podría mejorar o restaurar la capacidad de respuesta inmune general. Aunque muchas de las respuestas inmunes específicas son mediadas por células T CD8⁺ antígeno específicas, que pueden lisar o matar directamente las células diana, la mayoría de las respuestas inmunes requieren la ayuda de las células T CD4⁺, las que expresan moléculas inmuno-reguladoras importantes, tales como, por ejemplo, GM-CSF, CD40L, e IL-2. Cuando se prefiere ayuda mediada por CD4, un método tal como el descrito en la presente invención, que preserva o aumenta la relación CD4:CD8, podría tener un beneficio significativo. Un aumento del número de células T CD4⁺ puede aumentar la cantidad de CD40L expresado por las células e introducido en los pacientes, mejorando potencialmente la visibilidad de la célula diana (función mejorada de la APC). Pueden verse efectos similares al aumentar el número de células infundidas que expresan GM-CSF, o IL-2, todos los que se expresan predominantemente por las células T CD4⁺. Alternativamente, en situaciones donde se necesita menos la ayuda CD4 y se desea un mayor número de células T CD8⁺, se pueden usar además los enfoques XCELLERATE™ descritos en la presente, por ejemplo, mediante una pre-selección de células CD8⁺ antes de la estimulación y/o cultivo. Pueden existir situaciones donde se prefieren niveles aumentados de IFN-γ o un aumento de la citólisis de una célula diana. Además se puede modificar el tiempo y el tipo de exposición a los agentes estimulantes para expandir las células T con un repertorio de TCR deseado, *por ejemplo*, que expresen los genes deseados de la familia Vβ.

Para efectuar el aislamiento de las diferentes poblaciones de células T, se pueden variar los tiempos de exposición a las partículas. Por ejemplo, en una modalidad preferida, las células T se aíslan por incubación con perlas 3x28, tal como DYNABEADS® M-450, por un período de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. En una modalidad, el periodo de tiempo es aproximadamente 30 minutos. En una modalidad adicional, el periodo de tiempo es al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 horas. En aún otra modalidad preferida, el periodo de tiempo es de 10 a 24 horas o más. En una modalidad preferida, el periodo de tiempo de incubación es de 24 horas. Para el aislamiento de células T de pacientes con cáncer, el uso de tiempos de incubación más largos, tal como 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular.

En algunas modalidades, los tiempos de estimulación y/o expansión pueden ser de 10 semanas o menos, 8 semanas o menos, cuatro semanas o menos, 2 semanas o menos, 10 días o menos, u 8 días o menos (cuatro semanas o menos incluye todos los intervalos de tiempo desde 4 semanas a 1 día (24 horas) o cualquier valor entre estos números). En algunas modalidades puede desearse clonar las células T usando, por ejemplo, limitar la dilución o clasificación de células, en donde puede ser necesario un tiempo de estimulación más largo. En algunas modalidades, la estimulación y expansión pueden llevarse a cabo por 6 días o menos, 4 días o menos, 2 días o menos, y en otras modalidades tan poco como 24 horas o menos, y preferentemente 4-6 horas o menos (estos intervalos incluyen cualquier valor entero entre estos). Cuando la estimulación de las células T se lleva a cabo por períodos de tiempo más cortos, la población de células T puede no aumentar en número tan dramáticamente, pero la población proporcionará células T activadas más robustas y saludables que pueden continuar proliferando *in vivo* y se asemejan más a la reserva de células T efectoras naturales. Como la disponibilidad de ayuda de las células T frecuentemente es el factor limitante en las respuestas de anticuerpos a antígenos proteicos, la capacidad de expandir selectivamente o infundir selectivamente una población rica en células T CD4⁺ en un sujeto es extremadamente beneficiosa. Otras ventajas de tales poblaciones enriquecidas son fácilmente evidentes en que las células T cooperadoras activadas que reconocen los antígenos presentados por los linfocitos B dan dos tipos de estímulos, el contacto físico y la producción de citocinas, que resultan en la proliferación y diferenciación de células B.

En las diferentes modalidades, el experto en la materia entiende que la eliminación de la señal de estimulación de las

células depende del tipo de superficie usada. Por ejemplo, si se usan perlas paramagnéticas, entonces la separación magnética es una opción factible. Las técnicas de separación se describen en detalle por las instrucciones de los fabricantes de perlas paramagnéticas (por ejemplo, DYNAL Inc., Oslo, Noruega). Además, se puede usar la filtración si la superficie es una perla lo suficientemente grande como para ser separadas de las células. Adicionalmente, una variedad de filtros de transfusión están comercialmente disponibles, que incluyen filtros de transfusión de 20 micras y 80 micras (Baxter). En consecuencia, siempre y cuando las perlas sean más grandes que el tamaño de malla del filtro, tal filtración es altamente eficiente. En una modalidad relacionada, las perlas pueden pasar a través del filtro, pero las células pueden permanecer, y así permitir la separación. En una modalidad particular, la superficie biocompatible usada se degrada (*es decir* es biodegradable) en el cultivo durante el período de exposición.

Aunque los anticuerpos usados en los métodos descritos en la presente descripción pueden obtenerse fácilmente a partir de fuentes públicas, tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), los anticuerpos para las moléculas accesorias de las células T y el complejo CD3 pueden producirse por técnicas estándar. Las metodologías para generar los anticuerpos a usar en los métodos de la invención se conocen bien en la materia y se discuten con más detalle en la presente invención.

INMOVILIZACIÓN DE LIGANDOS SOBRE UNA SUPERFICIE

Como se indicó anteriormente, los métodos de la presente invención usan preferentemente ligandos unidos a una superficie. La superficie puede ser cualquier superficie capaz de tener un ligando unido a ella o integrado en ella y que sea biocompatible, es decir, prácticamente no tóxica para las células diana a estimular. La superficie biocompatible puede ser biodegradable o no biodegradable. La superficie puede ser natural o sintética, y una superficie sintética puede ser un polímero. La superficie puede comprender colágeno, proteínas purificadas, péptidos purificados, polisacáridos, glicosaminoglicanos, composiciones de matriz extracelular, liposomas, o superficies celulares. Un polisacárido puede incluir por ejemplo, celulosa, agarosa, dextrano, quitosana, ácido hialurónico, o alginato. Otros polímeros pueden incluir poliésteres, poliéteres, polianhidridos, polialquilsiloxanoacrilatos, poliacrilamida, poliortoésteres, polifosfazenos, polivinilacetatos, copolímeros de bloque, polipropileno, politetrafluoretileno (PTFE), o poliuretanos. El polímero puede ser ácido láctico o un copolímero. Un copolímero puede comprender ácido láctico y ácido glicólico (PLGA). Las superficies no biodegradables pueden incluir polímeros, tales como poli(dimetilsiloxano) y poli(etileno-acetato de vinilo). Las superficies biocompatibles incluyen por ejemplo, vidrio (*por ejemplo*, biovidrio), colágeno, quitina, metal, hidroxapatita, aluminato, materiales biocerámicos, polímeros de ácido hialurónico, alginato, polímeros de éster acrílico, polímero de ácido láctico, polímero de ácido glicólico, polímero de ácido láctico/ácido glicólico, proteínas purificadas, péptidos purificados, o composiciones de matriz extracelular. Otros polímeros que comprenden una superficie pueden incluir vidrio, sílice, silicio, hidroxapatita, hidrogeles, colágeno, acroleína, poliacrilamina, polipropileno, poliestireno, nilón, o cualquier polímero orgánico plástico o sintético, o similares. La superficie puede comprender una estructura biológica, tal como un liposoma o una superficie celular. La superficie puede estar en forma de un lípido, una placa, bolsa, comprimidos, fibra, malla, o partícula. Una partícula puede incluir, una partícula coloidal, una microesfera, una nanopartícula, una perla, o similares. En las distintas modalidades, las superficies comercialmente disponibles, tales como perlas u otras partículas, son útiles (*por ejemplo*, Partículas Miltenyi, Miltenyi Biotec, Alemania; perlas de Sefarosa, Pharmacia Fine Chemicals, Suecia; DYNABEADS™, Dynal Inc., Nueva York; PURABEADS™, Prometic Biosciences).

Cuando se usan las perlas, la perla puede ser de cualquier tamaño que efectúe la estimulación de la célula diana. En una modalidad, las perlas son preferentemente de aproximadamente 5 nanómetros a aproximadamente 500 μm de tamaño. En consecuencia, la selección del tamaño de la perla depende del uso particular para el cual servirá la perla. Por ejemplo, si la perla se usa para la reducción de monocitos, se escoge un tamaño pequeño para facilitar la ingestión del monocito (*por ejemplo*, 1.0 μm y 4.5 μm de diámetro o cualquier tamaño que pueda ser engullido, tal como tamaños de nanómetros); sin embargo, cuando se desea la separación de las perlas por filtración, típicamente se usan tamaños de perla de no más de 50 μm . Además, cuando se usan perlas paramagnéticas, típicamente las perlas están en un intervalo de tamaño de aproximadamente 2.8 μm a aproximadamente 500 μm y con mayor preferencia de aproximadamente 2.8 μm a aproximadamente 50 μm . Por último, se puede optar por utilizar nanopartículas super-paramagnéticas que pueden ser tan pequeñas como aproximadamente 10^5 nm. En consecuencia, como resulta fácilmente evidente a partir de la discusión anterior, virtualmente puede usarse cualquier tamaño de partícula.

Un agente puede estar unido, incorporado en, acoplado a, o integrado en una superficie por una variedad de métodos conocidos y disponibles en la materia. El agente puede ser un ligando natural, un ligando proteico, o un ligando sintético. El enlace puede ser covalente o no covalente, electrostático, o hidrófobo y se puede realizar por una variedad de medios de unión, que incluyen por ejemplo, químico, mecánico, enzimático, electrostático, u otros medios con el que un ligando es capaz de estimular las células. La unión del agente puede ser directa o indirecta (*por ejemplo* atado). Por ejemplo, el

anticuerpo a un ligando primero puede unirse a una superficie (enlace directo), o avidina o estreptavidina, o un segundo anticuerpo que se une al primero, puede estar unido a la superficie para la unión a un ligando biotinilado (enlace indirecto). Con respecto a las superficies celulares, la unión puede ser a través de la expresión genética del agente usando cualquiera de las tecnologías conocidas en la materia, tales como transfección o transducción, etc. de un vector de expresión que comprende la región codificante del agente de interés. El anticuerpo contra el ligando puede unirse a la superficie a través de un anticuerpo anti-idiotipo. Otro ejemplo incluye el uso de la proteína A o la proteína G, u otras moléculas de unión inespecífica a anticuerpos, unidas a las superficies para unir un anticuerpo. Alternativamente, el ligando puede unirse a la superficie mediante medios químicos, tales como el entrecruzamiento a la superficie, usando reactivos de entrecruzamiento disponibles comercialmente (Pierce, Rockford, IL) u otros medios. En algunas modalidades, los ligandos se unen covalentemente a la superficie. Además, en una modalidad, DYNABEADS™ activadas por tosilo o DYNABEADS™ con grupos reactivos epoxi en la superficie, disponibles comercialmente, se incuban con el ligando polipeptídico de interés de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, tales condiciones involucran típicamente la incubación en un tampón de fosfato de pH 4 a pH 9.5 a temperaturas en el intervalo de 4 a 37 grados C.

En un aspecto, el agente, tal como ciertos ligandos, puede ser de origen particular o de múltiples orígenes y pueden ser anticuerpos o fragmentos de estos, mientras que en otro aspecto, cuando se usan las células T, el ligando co-estimulador es una molécula B7 (*por ejemplo*, B7-1, B7-2). Estos ligandos se acoplan a la superficie por cualquiera de los diferentes medios de unión discutidos anteriormente. La molécula B7 a acoplarse a la superficie puede aislarse de una célula que expresa la molécula co-estimuladora, o puede obtenerse usando la tecnología estándar de ADN recombinante y sistemas de expresión que permiten la producción y el aislamiento de la molécula(s) co-estimuladora(s) como se describe en la presente. Pueden usarse además fragmentos, mutantes, o variantes de una molécula B7 que retengan la capacidad para desencadenar una señal co-estimuladora en las células T cuando se acoplan a la superficie de una célula. Además, el experto en la materia reconocerá que cualquier ligando útil en la activación e inducción de la proliferación de un subconjunto de células T también puede inmovilizarse sobre perlas o superficies de los recipientes de cultivo o cualquier superficie. Adicionalmente, aunque la unión covalente del ligando a la superficie es una metodología preferida, también puede usarse la adsorción o captura por un anticuerpo monoclonal secundario. La cantidad de un ligando particular unido a una superficie puede determinarse fácilmente por análisis de citometría de flujo si la superficie es de perlas o determinarse por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) si la superficie es por ejemplo, una placa de cultivo de tejidos, una malla, fibras, bolsas.

En una modalidad particular, la forma estimuladora de una molécula B7 o un anticuerpo anti-CD28 o fragmento de este está unida a la misma superficie de fase sólida que el agente que estimula el complejo TCR/CD3, tal como un anticuerpo anti-CD3. Adicionalmente a los anticuerpos anti-CD3, pueden usarse otros anticuerpos que se unan a los receptores que imitan las señales antigénicas. Por ejemplo, las perlas u otras superficies pueden recubrirse con combinaciones de anticuerpos anti-CD2 y una molécula B7 y en particular con anticuerpos anti-CD3 y anticuerpos anti-CD28.

Cuando se acoplan a una superficie, los agentes pueden acoplarse a la misma superficie (*es decir*, en formación "cis") o a superficies separadas (*es decir*, en formación "trans"). Alternativamente, un agente puede acoplarse a una superficie y el otro agente puede estar en solución. En una modalidad, el agente que proporciona la señal co-estimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En una modalidad preferida, los dos agentes están inmovilizados sobre perlas, lo mismo sobre la misma perla, *es decir*, en "cis", que sobre perlas separadas, *es decir*, en "trans". 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 están co-inmovilizados a la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En una modalidad, se usa una relación 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para la expansión de células T CD4⁺ y el crecimiento de células T. En algunos aspectos de la presente invención, se usa una relación de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las perlas de modo que se observa un aumento en la expansión de las células T en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En una modalidad particular se observa un aumento de aproximadamente .5 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En una modalidad, la relación de los anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas está en el intervalo de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre estos. En un aspecto de la presente invención, hay más anticuerpo anti-CD28 unido a las partículas que anticuerpo anti-CD3, *es decir* la relación de CD3:CD28 es menor que uno. En algunas modalidades de la invención, la relación del anticuerpo anti CD28 al anticuerpo anti CD3 unidos a las perlas es mayor que 2:1. En una modalidad particular, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:200. En una modalidad particular, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:150. En una modalidad particular, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:100. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:75. En una modalidad adicional, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:50. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:45. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:40. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos

CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:35. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:30. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:25. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:20. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:15. En una modalidad preferida, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:10. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:5. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:4. En otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 1:3. En aún otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 3:1.

10 AGENTES ASOCIADOS A LA SUPERFICIE

Los agentes contemplados incluyen ligandos de proteína, ligandos naturales, y ligandos sintéticos. Los agentes que pueden unirse a porciones de la superficie celular, y bajo ciertas condiciones causan ligación y agregación que conduce a una señalización, incluyen, pero sin limitarse a, lectinas (por ejemplo, fitohemaglutinina (PHA), lectina de lentejas, concanavalina A), anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, polipéptidos, glicopéptidos, receptores, ligandos del receptor de célula B y del receptor de célula T, dímeros o tetrámeros de MHC-péptido, componentes de la matriz extracelular, esteroides, hormonas (por ejemplo, hormona del crecimiento, corticosteroides, prostaglandinas, tetra-yodo tironina), porciones bacterianas (tales como lipopolisacáridos), mitógenos, superantígenos y sus derivados, factores de crecimiento, citocinas, moléculas de adhesión (tales como, L-selectina, LFA-3, CD54, LFA-1), quimocinas, y moléculas pequeñas. Los agentes pueden aislarse de fuentes naturales tales como células, productos de la sangre, y tejidos, o aislarse de células propagadas *in vitro*, preparadas de manera recombinante, por síntesis química, o por otros métodos conocidos por aquellos expertos en la materia.

En un aspecto, cuando se desea estimular a las células T, los agentes útiles incluyen ligandos que son capaces de unirse al complejo CD3/TCR, CD2, y/o CD28 y de iniciar la activación o la proliferación, respectivamente. En consecuencia, el término ligando incluye aquellas proteínas que son el ligando "natural" para la proteína de la superficie celular, tal como una molécula B7 para el CD28, así como ligandos artificiales tales como anticuerpos dirigidos contra la proteína de la superficie celular. Tales anticuerpos y fragmentos de estos pueden producirse de acuerdo con técnicas convencionales, tales como los métodos de hibridoma y técnicas de ADN recombinante y expresión de proteínas. Los anticuerpos y fragmentos útiles pueden derivarse de cualquier especie, que incluye seres humanos, o pueden formarse como proteínas quiméricas, las que emplean secuencias de más de una especie.

Pueden usarse métodos bien conocidos en la materia para generar anticuerpos, antiseros policlonales, o anticuerpos monoclonales específicos para un ligando. Los anticuerpos pueden producirse además como inmunoglobulinas modificadas genéticamente (Ig) o fragmentos de Ig diseñados para que tengan propiedades deseables. Por ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, los anticuerpos pueden incluir una IgG recombinante que es una proteína de fusión quimérica con al menos un dominio de la región variable (V) de una primera especie de mamífero, y al menos un dominio de la región constante de una segunda especie diferente de mamífero. Más comúnmente, un anticuerpo quimérico tiene secuencias de una región variable murina y secuencias de una región constante humana. Tal inmunoglobulina quimérica murina/humana puede "humanizarse" al injertar regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que confieren especificidad de unión a un antígeno, derivadas de un anticuerpo murino dentro de regiones marco de la región V de origen humano y las regiones constantes de origen humano. Además, los anticuerpos que contienen CDR de diferentes especificidades pueden combinarse para generar anticuerpos multi-específicos (bi o tri-específicos, etc.). Los fragmentos de estas moléculas pueden generarse mediante digestión proteolítica, u opcionalmente, mediante digestión proteolítica seguida de una reducción suave de los enlaces disulfuro y de la alquilación, o mediante técnicas de ingeniería genética recombinante.

Los anticuerpos se definen como "inmunoespecíficos" si se unen específicamente al antígeno con una constante de afinidad, K_a , mayor que o igual a aproximadamente 10^4 M^{-1} , preferentemente mayor que o igual a aproximadamente 10^5 M^{-1} , con mayor preferencia mayor que o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1} , y aún con mayor preferencia mayor que o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} . Las afinidades de los pares de unión o anticuerpos pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo, las descritas por Scatchard y otros (Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 51:660, 1949) o por resonancia de plasmón superficial (BIAcore, Biosensor, Piscataway, NJ) *Ver, por ejemplo*, Wolff y otros, Cancer Res., 53:2560-2565, 1993).

Los anticuerpos pueden prepararse generalmente mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia (*Ver, por ejemplo*, Harlow y otros, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory). En una técnica de este tipo, un animal se inmuniza con el ligando como antígeno para generar antiseros policlonales. Los animales adecuados incluyen conejos, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno, y pueden incluir especies

de mamíferos más pequeños, tales como, ratones, ratas, y hámsteres. Los anticuerpos de la presente invención pueden además generarse como se describe en las patentes de los Estados Unidos Patent núms.: 6,150,584, 6,130,364, 6,114,598, 5,833,985, 6,071,517, 5,756,096, 5,736,137, y 5,837,243.

5 Un inmunógeno puede estar compuesto por células que expresan el ligando, polipéptidos ligandos purificados o parcialmente purificados o variantes o fragmentos de estos, o péptidos ligandos. Los péptidos ligandos pueden ser generados por escisión proteolítica o pueden ser sintetizados químicamente. Los péptidos para la inmunización pueden seleccionarse analizando la estructura primaria, secundaria, o terciaria del ligando de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia para determinar las secuencias de aminoácidos que más probablemente genere una respuesta
10 antigénica en un animal huésped (*Ver, por ejemplo*, Novotny, Mol. Immunol. 28:201-207, 1991; Berzoksky, Science 229:932-40, 1985).

La preparación del inmunógeno puede incluir el acoplamiento covalente del polipéptido ligando o variante o fragmento de este, o péptido de otra proteína inmunogénica, tales como la hemocianina de lapas ojo de cerradura o la albúmina de suero
15 bovino. Adicionalmente, el péptido, polipéptido, o células pueden ser emulsionados en un adyuvante (*Ver* Harlow y otros, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988 Cold Spring Harbor Laboratory). Generalmente, después de la primera inyección, los animales reciben una o más inmunizaciones de refuerzo de acuerdo con un programa preferible para la especie animal. La respuesta inmune puede controlarse mediante la toma periódica de sangre del animal, separando el suero, y analizando los sueros en un inmunoensayo, tal como un ensayo de Ouchterlony, para evaluar el título del anticuerpo específico. Una vez
20 que se establece un título de anticuerpos, se pueden tomar muestras de sangre periódicas a los animales para acumular los antisueros policlonales. Los anticuerpos policlonales que se unen específicamente al polipéptido ligando o al péptido después pueden purificarse a partir de tales antisueros, por ejemplo, por cromatografía de afinidad usando la proteína A o usando el polipéptido ligando o el péptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

25 Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a los polipéptidos ligandos o fragmentos o variantes de estos pueden prepararse, por ejemplo, usando la técnica de Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975; Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976) y mejoras a ellos. Los hibridomas, que son líneas celulares eucariotas inmortales, pueden generarse de manera que produzcan anticuerpos con la especificidad deseada a un polipéptido ligando o variante o fragmento de este. Un animal -por ejemplo, una rata, un hámster, o preferentemente un ratón- se inmuniza con el ligando inmunógeno preparado
30 como se describió anteriormente. Las células linfoides, más comúnmente, células del bazo, obtenidas de un animal inmunizado pueden immortalizarse mediante la fusión con un par de fusión celular de mieloma sensible a drogas, preferentemente uno que sea singénico con el animal inmunizado. Las células del bazo y las células de mieloma pueden combinarse durante unos pocos minutos con un agente promotor de fusión de membranas, tal como el polietilenglicol o un detergente no iónico, y después sembrarse a baja densidad en un medio selectivo que soporta el crecimiento de células de
35 hibridoma, pero no de las células de mieloma. Un medio de selección preferido es HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, por lo general aproximadamente de 1 a 2 semanas, se observan colonias de células. Las colonias individuales se aíslan, y los anticuerpos producidos por las células pueden evaluarse en cuanto a la actividad de unión al polipéptido ligando o variante o fragmento de este. Se prefieren los hibridomas que producen anticuerpos con alta afinidad y especificidad para el antígeno ligando. En la presente invención se contemplan los hibridomas que producen
40 anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un polipéptido ligando o variante o fragmento de este.

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar de los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas. Un método alternativo para la producción de un anticuerpo monoclonal murino es inyectar las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un
45 ratón singénico. El ratón produce líquido ascítico que contiene el anticuerpo monoclonal. Los contaminantes pueden eliminarse del anticuerpo por técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación, o extracción.

Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse por cualquiera de las técnicas. Los métodos incluyen pero sin limitarse a, transformación del virus de Epstein Barr (EBV) de células humanas de sangre periférica (*ver*, la patente de Estados Unidos núm. 4,464,456), inmunización *in vitro* de células B humana (*ver, por ejemplo*, Boerner y otros, J. Immunol. 147:86-95, 1991), fusión de células del bazo de ratones transgénicos inmunizados que portan genes de inmunoglobulina humana y fusión de las células de bazo de ratones transgénicos inmunizados que portan gene de inmunoglobulina insertadas por el cromosoma artificial de levadura (YAC) (*ver, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 5,877,397; Bruggemann y otros, Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58, 1997; Jakobovits y otros, Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:525-35, 1995), o
55 aislamiento de genotecas de fago de la región V de inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados a usarse en la presente invención pueden generarse. Un anticuerpo quimérico tiene al menos un dominio de la región constante derivado de una primera especie de mamífero y al

menos un dominio de la región variable derivado de una segunda especie diferente de mamífero (*ver, por ejemplo*, Morrison y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 81:6851-55, 1984). Más comúnmente, un anticuerpo quimérico puede construirse clonando las secuencias de polinucleótidos que codifican al menos un dominio de la región variable derivada de un anticuerpo monoclonal no humano, tal como la región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino, de rata, o de hámster, en un vector que contiene las secuencias que codifican al menos una región constante humana. (*Ver, por ejemplo*, Shin y otros, Methods Enzymol. 178:459-76, 1989; Walls y otros, 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 materia para generar anticuerpos quiméricos es la recombinación homóloga (patente de Estados Unidos núm. 5,482,856). Preferentemente, los vectores se transfectan en células eucariotas para la expresión estable del anticuerpo quimérico.

Un anticuerpo quimérico no-humano/humano puede además diseñarse por ingeniería genética para crear un anticuerpo "humanizado". Dicho anticuerpo tiene una pluralidad de CDR derivadas de una inmunoglobulina de una especie de mamífero no humano, al menos una región de marco variable humana, y al menos una región constante de inmunoglobulina humana. La humanización puede producir un anticuerpo con una afinidad de unión reducida en comparación con el anticuerpo monoclonal no humano o el anticuerpo quimérico. Los expertos en la materia, por lo tanto, usan una o más estrategias para diseñar anticuerpos humanizados.

Dentro de algunas modalidades, puede preferirse el uso de fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fab o fragmentos F(ab')₂, que pueden prepararse por digestión proteolítica con papaína o pepsina, respectivamente. Los fragmentos de unión al antígeno pueden separarse de los fragmentos Fc mediante cromatografía de afinidad, por ejemplo, usando la proteína A inmovilizada o el polipéptido ligando inmovilizado o una variante o un fragmento de este. Un método alternativo para generar fragmentos Fab incluye la reducción suave de los fragmentos F(ab')₂ seguida por la alquilación (*ver, por ejemplo*, Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston).

Las regiones variables no humanas, humanas, o humanizadas de la cadena ligera y de la cadena pesada de cualquiera de las moléculas de Ig descritas anteriormente pueden construirse como fragmentos Fv de cadena sencilla (sFv) (anticuerpos de cadena sencilla). *Ver, por ejemplo*, Bird y otros, Science 242:423-426, 1988; Huston y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85:5879-5883, 1988. Las proteínas de fusión multifuncionales pueden generarse uniando las secuencias de polinucleótidos que codifican un sFv en marco con las secuencias de polinucleótidos que codifican varias proteínas efectoras. Estos métodos se conocen en la materia, y se describen, por ejemplo, en EP-B1-0318554, la patente de los Estados Unidos núm. 5,132,405, la patente de los Estados Unidos núm. 5,091,513, y la patente de los Estados Unidos núm. 5,476,786.

Un método adicional para seleccionar los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido ligando o variante o fragmento de este es por la exhibición de fago (*Ver, por ejemplo*, Winter y otros, Annul. Rev. Immunol. 12:433-55, 1994; Burton y otros, Adv. Immunol. 57:191-280, 1994). Las genotecas combinatorias del gen de región variable de inmunoglobulina humana o murina puede crearse en vectores de fago que pueden tamizarse para seleccionar fragmentos de Ig (Fab, Fv, sFv, o multímeros de estos) que se unen específicamente a un polipéptido ligando o variante o fragmento de este (*Ver, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 5,223,409; Huse y otros, Science 246:1275-81, 1989; Kang y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 88:4363-66, 1991; Hoogenboom y otros, J. Molec. Biol. 227:381-388, 1992; Schlebusch y otros, Hybridoma 16:47-52, 1997 y las referencias citadas en ellas).

MÉTODOS DE USO

Generalmente, las composiciones y metodologías descritas en la presente invención pueden usarse para eliminar al menos una porción de las poblaciones clonales de células T indeseadas de una población de células inmunes. Los métodos de la presente invención se usan además para expandir selectivamente una población de células de las que se suprimieron poblaciones clonales indeseadas para usar en el tratamiento de defectos inmunes asociados con el trasplante de células madre hematopoyéticas (que incluyen alotrasplante y autotrasplante a partir de fuentes que incluyen sangre, sangre del cordón umbilical, y la médula ósea), trasplante de órganos (*por ejemplo*, GVHD aguda o crónica), y enfermedades autoinmunes, que incluyen la enfermedad autoinmune causada por cánceres tales como la leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL), la leucemia linfocítica crónica (CLL) o por inmunodeficiencia variable común. Como resultado, se puede producir una población de células, en el caso de las células T, que expresan TCR que son policlonales con respecto a la reactividad del antígeno, pero esencialmente homogénea con respecto a CD4⁺ o CD8⁺, que se aclararon de cualquier subpoblación celular indeseada, tales como células autorreactivas o células alorreactivas. Adicionalmente, el método permite la expansión de la población resultante de células T en números suficientes para reconstituir la población total de

células T CD4⁺ o CD8⁺ de un individuo (la población de linfocitos en un individuo es de aproximadamente 5×10^{11} células). La población de células resultante puede además transducirse genéticamente usando una variedad de técnicas conocidas por el técnico con experiencia y usadas para la inmunoterapia.

5 El principal problema en el trasplante de células madre hematopoyéticas es la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), que es causada por células T alorreactivas presentes en la preparación infundida de células madre hematopoyéticas. Así, la presente invención puede usarse para eliminar las células T alorreactivas y para expandir la población restante de células T para su infusión al paciente. Las composiciones celulares de la presente invención pueden usarse solas o junto con otras terapias.

10 Las composiciones de células T creadas por la presente invención pueden usarse en el contexto de cualquier enfermedad autoinmune. Las enfermedades autoinmunes ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide, esclerosis progresiva sistémica, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, polimiositis, dermatomiositis, uveitis, artritis, diabetes dependiente de insulina tipo I, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis de Grave, miastenia gravis, miocarditis autoinmune, vasculitis, anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmune, síndrome mielodisplásico, síndrome de Evan, síndrome de la persona rígida, dermatitis atópica, soriasis, síndrome de Behchet, enfermedad de Crohn, cirrosis biliar, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerativa, síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, hemaglobinuria nocturna paroxismal, mielodisplásico, trastornos alérgicos como fiebre del heno, asma extrínseca, o alergias a las picadas de insectos y picaduras, y alergias a alimentos y fármacos.

20 Otros usos de las composiciones de células T generadas por la presente invención pueden incluir el tratamiento y/o profilaxis de: enfermedades inflamatorias e hiperproliferativas de la piel y manifestaciones cutáneas de enfermedades mediadas inmunológicamente, tales como, dermatitis seborreica, angioedemas, eritemas, acné, y Alopecia areata; varias enfermedades de los ojos (autoinmunes y de cualquier otra tipo); reacciones alérgicas, tales como alergias al polen, enfermedad respiratoria obstructiva reversible, que incluye afecciones como el asma (por ejemplo, asma bronquial, asma alérgica, asma intrínseca, asma extrínseca y asma por polvo), particularmente asma crónica o inveterada (por ejemplo, asma tardía e hipersensibilidad de las vías respiratorias), bronquitis, rinitis alérgica, y similares; inflamación de la mucosa y de los vasos sanguíneos.

30 Como se señaló anteriormente, las composiciones de células T generadas por la presente invención pueden usarse en el tratamiento de defectos inmunes asociados con el trasplante de órganos, *por ejemplo*, la enfermedad de injerto contra huésped. En la presente se contempla el tratamiento de defectos inmunes asociados con cualquier trasplante de órganos. Por ejemplo, los métodos y células generados por la presente invención pueden usarse en el tratamiento de defectos inmunes asociados con el trasplante de riñón, corazón, pulmón, e hígado.

35 En algunas modalidades, las células generadas por la presente solicitud se administran a un paciente después del tratamiento con un agente tal como quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato, y FK506, anticuerpos, u otros agentes immunoablativos como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, ciclofosfamida, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por los factores de crecimiento (rapamicina). (Liu y otros, Cell 66:807-815, 1991; Henderson y otros, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer y otros, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993; Isoniemi (supra)). En una modalidad adicional, las composiciones celulares se administran a un paciente con una enfermedad autoinmune después de una terapia ablativa de células T usando cualquiera de los agentes quimioterapéuticos tales como, fludarabina, radioterapia con haz externo (CRT), ciclofosfamida, o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En otra modalidad, las composiciones celulares generadas por la presente solicitud se administran a un paciente con una enfermedad autoinmune después de una terapia ablativa de células B, tales como agentes que reaccionan con el CD20, *por ejemplo*, el Rituxan. La dosificación de los tratamientos anteriores para administrarlos a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección a tratar y el receptor del tratamiento. El escalado de dosis para la administración en seres humanos puede realizarse de acuerdo con las prácticas aceptadas en la materia. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, estará generalmente en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, administrado por lo general diariamente durante un periodo entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es 1 a 10 mg por día aunque en algunos casos pueden usarse dosis superiores de hasta 40 mg por día (descrito en la patente de Estados Unidos núm. 6,120,766).

55 En un aspecto adicional, al menos una porción sustancial de las células autorreactivas de un paciente se eliminan *in vitro* usando los métodos de la presente invención y después son estimuladas y expandidas adicionalmente y administradas al paciente. En una modalidad relacionada, al menos una porción sustancial de las células autorreactivas de un paciente se eliminan *in vitro* usando los métodos de la presente solicitud y después se administran al paciente y se expanden *in vivo*. Se

tiene concebido como un aspecto que las composiciones generadas por la presente solicitud pueden usarse junto con otras terapias disponibles en la materia para el tratamiento de la enfermedad autoinmune.

En una modalidad, las células T pueden estimularse y expandirse como se describe en la presente invención para inducir o aumentar la capacidad de respuesta en un individuo que está inmunodeprimido como resultado del tratamiento asociado con el trasplante de células madre hematopoyéticas. La presente solicitud proporciona métodos para reducir el riesgo de, o la severidad de, un efecto adverso de la GVHD en un paciente que experimenta un trasplante de células madre hematopoyéticas, que comprende administrar al paciente una población de células T de la presente solicitud. En una modalidad particular, al menos una porción sustancial de las células alorreactivas presentes en las células madre hematopoyéticas del donante se eliminan mediante los métodos de la presente solicitud. En una modalidad adicional, las composiciones de células T generadas por la presente solicitud se administran a un paciente que experimenta un trasplante de células madre hematopoyéticas después del tratamiento con agentes quimioterapéuticos. En una modalidad adicional, al menos una porción sustancial de las células alorreactivas de la médula del donante se eliminan *in vitro* usando los métodos de la presente solicitud y después son estimuladas y expandidas adicionalmente y después administradas al paciente. En una modalidad adicional, al menos una porción sustancial de las células alorreactivas de la médula del donante se eliminan *in vitro* usando los métodos de la presente solicitud después administradas al paciente y expandidas *in vivo*. Se tiene concebido como un aspecto que las composiciones generadas por la presente solicitud pueden usarse junto con otras terapias disponibles en la materia para su uso en el trasplante de células madre hematopoyéticas, tales como la administración de G-CSF, IL-2, IL-11, IL-7, IL -12 y tratamientos antivirales.

En una modalidad, las células T pueden estimularse y expandirse como se describe en la presente para inducir o aumentar la capacidad de respuesta en un individuo que está inmunodeprimido, como resultado del tratamiento asociado con el trasplante de órganos, que incluye pero no se limita a, trasplante de riñón, corazón, pulmón, e hígado. En una modalidad particular, al menos una porción sustancial de las células alorreactivas presentes en el receptor se eliminan mediante los métodos de la presente solicitud. Así, la presente solicitud proporciona métodos para reducir el riesgo, o la severidad, del rechazo del órgano. En una modalidad adicional, las composiciones de células T generadas por la presente solicitud se administran a un paciente que experimenta un trasplante de órgano después del tratamiento con agentes quimioterapéuticos. En una modalidad adicional, al menos una porción sustancial de las células alorreactivas del receptor del trasplante se eliminan *in vitro* usando los métodos de la presente solicitud y después son estimuladas y expandidas adicionalmente y después administradas al paciente. Se tiene concebido como un aspecto que las composiciones generadas por la presente solicitud pueden usarse junto con otras terapias disponibles conocidas en la materia para su uso en el trasplante de órganos.

Otra modalidad, proporciona un método para expandir selectivamente una población de células TH1 a partir de una población de células T CD4⁺. En este método, las células T CD4⁺ se co-estimulan con un anticuerpo anti-CD28, tal como el anticuerpo monoclonal 9.3, que induce la secreción de citocinas específicas de Till, que incluyen el IFN- γ , lo que resulta en el enriquecimiento de las células T_{H1} sobre las células T_{H2}.

La presente solicitud proporciona además un método para expandir selectivamente una población de células TH2 a partir de una población de células T CD4⁺. En este método, las células T CD4⁺ son co-estimuladas con un anticuerpo anti-CD28, tal como el anticuerpo monoclonal B-T3, XR-CD28, lo que induce la secreción de citocinas específicas de T_{H2}, que resulta en el enriquecimiento de células T_{H2} sobre las células T_{H1} (ver por ejemplo, Fowler, y otros, Blood 1994 Nov. 15;84(10):3540-9; Cohen, y otros, Ciba Found Symp 1994; 187:179-93).

La presente solicitud proporciona además métodos para el uso de las composiciones instantáneas de células junto con células T reguladoras. Las células T reguladoras pueden generarse usando técnicas reconocidas en la materia como se describe por ejemplo, en Woo, y otros, J Immunol. 2002 mayo 1;168(9):4272-6; Shevach, E.M., Annu. Rev. Immunol. 2000, 18:423; Stephens, y otros, Eur. J. Immunol. 2001, 31:1247; Salomon, y otros, Immunity 2000, 12:431; y Sakaguchi, y otros, Immunol. Rev. 2001,182:18.

La presente solicitud proporciona además un método para expandir selectivamente una población de células T que expresan un gen V β , V α , V γ o V δ específico. Por ejemplo, en este método, las células T que expresan un gen V β , V α , V γ o V δ en particular se seleccionan positivamente o negativamente y después se expanden/estimulan aún más de acuerdo con los métodos de la presente solicitud. Alternativamente, las células T estimuladas y expandidas que expresan un gen de interés V β , V α , V γ o V δ en particular pueden seleccionarse positivamente o negativamente y ser estimuladas y expandidas aún más.

En otro ejemplo, la sangre se extrae directamente del paciente en un dispositivo desechable autónomo que contiene una

composición sensibilizante y/o dos o más anticuerpos inmovilizados (por ejemplo, anti-CD3 y anti-CD28) u otros componentes para 69 estimular los receptores necesarios para la activación de las células T antes que las células sean administradas al sujeto (*por ejemplo*, inmovilizados sobre superficies de plástico o sobre micropartículas separables). En una modalidad, el dispositivo desechable puede comprender un contenedor (*por ejemplo*, una bolsa de plástico, o un frasco) con conexiones adecuadas de los tubos apropiadas para combinarse/conectarse con jeringas y dispositivos de conexión estériles. Este dispositivo contendrá una superficie sólida para la inmovilización de los componentes de activación de las células T (*por ejemplo*, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28); estas pueden ser las superficies del propio recipiente o un accesorio y será típicamente una superficie plana, una superficie plana grabada, una superficie irregular, una almohadilla porosa, de fibra, un fluido férrico clínicamente aceptable/seguro, perlas, etc.). Además cuando se use el dispositivo autónomo, el sujeto puede permanecer conectado al dispositivo, o el dispositivo puede separarse del paciente. Además, el dispositivo puede usarse a temperatura ambiente o incubarse a temperatura fisiológica usando una incubadora portátil.

Dado que los dispositivos y métodos para extraer y procesar sangre y productos sanguíneos son bien conocidos, un experto en la materia reconocerá fácilmente que dadas las enseñanzas proporcionadas en la presente invención, una variedad de dispositivos que cumplen con las necesidades que se exponen anteriormente pueden diseñarse fácilmente o modificarse a partir de dispositivos existentes. En consecuencia, como tales dispositivos y métodos no están limitados por las modalidades específicas que se exponen en la presente descripción, sin embargo incluirían cualquier dispositivo o metodología capaz de mantener la esterilidad y mantener la sangre en forma fluida en la que la activación del complemento está reducida y en donde los componentes necesarios para la activación de las células T (*por ejemplo*, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 o ligandos de los mismos) pueden inmovilizarse o separarse de la sangre o producto sanguíneo antes de la administración al sujeto. Además, como los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente se puede usar una variedad de productos de la sangre junto con los dispositivos y métodos descritos en la presente. Por ejemplo, los métodos y dispositivos podrían usarse para proporcionar una activación rápida de las células T de sangre total criopreservada, de células mononucleares de sangre periférica, de otras células derivadas de sangre criopreservada, o líneas de células T criopreservadas de la descongelación y antes de la administración al sujeto. En otro ejemplo, los métodos y dispositivos pueden usarse para reforzar la actividad de un producto de células T previamente expandidas *ex vivo* o de una línea de células T antes de la administración al sujeto, proporcionando así un producto de células T altamente activadas. Por último, como se apreciará fácilmente los métodos y dispositivos anteriores pueden usarse para la terapia celular autóloga o alogénica simultáneamente con el sujeto y el donante.

Los métodos de la presente solicitud pueden usarse además con las vacunas para potenciar la reactividad del antígeno y aumentar el efecto *in vivo*. En una modalidad, las composiciones generadas por la presente solicitud se administran a un paciente junto con una composición que aumenta las células T *in vivo*, por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, e IL-15. Además, dado que las células T expandidas por la presente solicitud tienen una vida media relativamente larga en el cuerpo, estas células podrían actuar como vehículos perfectos para la terapia génica, al portar una secuencia deseada de ácido nucleico de interés y potencialmente dirigirse hacia los sitios de cáncer, enfermedad, o infección. En consecuencia, las células expandidas por la presente solicitud pueden darse a un paciente en combinación con una vacuna, una o más citocinas, uno o más anticuerpos terapéuticos, etc. Virtualmente cualquier terapia que se beneficie de una población de células T más robusta está dentro del contexto de los métodos de uso descritos en la presente invención.

Existe gran variedad de modelos *in vitro* y modelos animales para probar y validar las composiciones celulares generadas por la presente solicitud y su aplicabilidad a una enfermedad o indicación relacionada con el sistema inmune en particular. En consecuencia, un experto en la materia podría elegir fácilmente el modelo adecuado a partir de los existentes actualmente en la materia. Tales modelos incluyen el uso de ratones NOD, donde la IDDM resulta de una destrucción autoinmune espontánea, dependiente de células T, de las células pancreáticas β productoras de insulina, que se intensifica con la edad (Bottazzo y otros, J. Engl. J. Med., 113:353, 1985; Miyazaki y otros, Clin. Exp. Immunol., 60:622,1985). En los ratones NOD, un modelo de IDDM humana, las estrategias terapéuticas que se dirigen a las células T han tenido éxito en la prevención de la IDDM (Makin y otros, Exp. Anim., 29:1, 1980). Estos incluyen la timectomía neonatal, la administración de ciclosporina, y la infusión de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-pan para células T, anti-CD4, o anti-CD25 (IL-2R) (Tarui y otros, Insulinitis and Type I Diabetes Lessons from the NOD Mouse, Academic Press, Tokio, págs.143,1986). Otros modelos incluyen, por ejemplo, los usados típicamente para enfermedades autoinmunes e inflamatorias, tales como la esclerosis múltiple (modelo de EAE), la artritis reumatoide, la enfermedad de injerto contra huésped (modelos de trasplante para estudiar el rechazo de injertos usando injertos de piel, trasplante de corazón, trasplantes de islotes de Langerhans, trasplantes intestinales grandes y pequeños, y similares), los modelos de asma, de lupus eritematoso sistémico (autoinmunidad sistémica — modelos lpr o NZBx NZW F1), y similares (ver, por ejemplo, Takakura y otros, Exp. Hematol. 27(12):1815-821, 199; Hu y otros, Immunology 98(3):379-385,1999; Blyth y otros, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 14(5):425-438, 1996; Theofilopoulos y Dixon, Adv. Immunol. 37:269-389, 1985; Eisenberg y otros, J. Immunol. 125:1032-1036, 1980; Bonneville y otros, Nature 344:163-165, 1990; Dent y otros, Nature 343:714-719, 1990; Todd y otros, Nature 351:542-547,

1991; Watanabe y otros, *Biochem Genet.* 29:325-335, 1991; Morris y otros, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 57:263-273, 1990; Takahashi y otros, *Cell* 76:969-976, 1994; *Current Protocols in Immunology*, Richard Coico (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., Capítulo 15, 1998).

- 5 La artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo animal de artritis reumatoide (AR), dependiente de células T (D. E. Trentham y otros, "Autoimmunity to Type II Collagen: An Experimental Model of Arthritis," *J. Exp. Med.* 146: 857-868 (1977)). En dos semanas después de la inmunización con colágeno tipo II (CII) en IFA, las ratas susceptibles desarrollan una poliartritis con cambios histológicos con formación de pannus y erosión del hueso/cartílago. Adicionalmente, las respuestas humoral y celular al CII se producen en la CIA así como en la RA (E. Brahn, "Rheumatoid Arthritis: Clues to Etiology and Treatment" in *Clinical Orthopedics and Related Research* (B. Hahn, ed., Filadelfia, JB Lippincott Company, 1991). Por consiguiente, la CIA es un modelo animal útil de RA que sirve como un sistema *in vivo* para la investigación de nuevas intervenciones terapéuticas potenciales como se describe en la presente solicitud.

Composiciones farmacéuticas

- 15 Las poblaciones de células T de la presente solicitud pueden administrarse solas, o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. En resumen, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una población de células diana como se describe en la presente invención, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (*por ejemplo*, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones se formulan preferentemente para administración intravenosa. La presente solicitud proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden composiciones sensibilizantes como se describe en la presente.

- Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de una manera adecuada para la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de la administración se determinarán por factores tales como la afección del paciente, y el tipo y severidad de enfermedad del paciente, aunque las dosis adecuadas pueden determinarse por ensayos clínicos. Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente efectiva" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa a administrar de las composiciones de la presente invención puede determinarse por un médico considerando las diferencias individuales en edad, peso, severidad de la enfermedad y condición del paciente y cualquier otro factor relevante para el tratamiento del paciente. Por lo general puede afirmarse que una composición farmacéutica que comprende las células T de un sujeto, puede administrarse a una dosis de 10^4 a 10^7 APC/kg de peso corporal, preferentemente 10^5 a 10^6 APC/kg de peso corporal, que incluye todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones celulares pueden administrarse además múltiples veces en estas dosis. Las células pueden administrarse mediante el uso de técnicas de infusión que se conocen comúnmente en la inmunoterapia (ver, *por ejemplo*, Rosenberg y otros, *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988). La dosificación óptima y el régimen de tratamiento para un paciente en particular pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia de la medicina mediante el seguimiento de los signos de la enfermedad del paciente y ajustando el tratamiento en consecuencia.

- En algunos estudios de inmunoterapia adoptiva, las células T se administran aproximadamente de 1×10^9 a 2×10^{11} células al paciente. (Ver, *por ejemplo*, patente de los Estados Unidos. núm. 5,057,423). En algunos aspectos, particularmente en el uso de células alogénicas o xenogénicas, pueden administrarse números inferiores de células, en el intervalo de 10^6 /kilogramo (10^6 a 10^{11} por paciente). En algunas modalidades, las células T o B se administran a 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , o 1×10^{12} células al sujeto. Las composiciones de células T o B pueden administrarse múltiples veces en dosis que estén dentro de estos intervalos. Las células T o B pueden ser autólogas o heterólogas (alogénicas o xenogénicas) con respecto al paciente que experimenta la terapia. Si se desea, el tratamiento puede incluir además la administración de mitógenos (*por ejemplo*, PHA) o linfocinas, citocinas, y/o quimocinas (*por ejemplo*, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP 1 a, etc.) como se describe en la presente para mejorar la restauración de la respuesta inmune.

- Las composiciones generadas por la presente invención pueden ser útiles en métodos para prevenir, inhibir, o reducir la severidad de la enfermedad autoinmune en un animal, que comprenden administrar a un animal una cantidad efectiva de las células T policlonales activadas del sujeto que han sido aclaradas de subpoblaciones de células T autorreactivas indeseadas. Las composiciones de células T pueden administrarse junto con una terapia ablativa de células T y/u otras terapias para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Las composiciones generadas por la presente invención pueden ser útiles al proporcionar métodos para prevenir, inhibir, o reducir la severidad de la enfermedad de injerto contra huésped en un animal que requiere un trasplante de células madre hematopoyéticas, que comprende administrar a un animal una cantidad efectiva de médula ósea del sujeto donante que ha sido aclarada de subpoblaciones indeseadas de células T alorreactivas. Las composiciones pueden administrarse junto con otras terapias para el tratamiento de defectos inmunes asociados con el trasplante de células madre hematopoyéticas.

Las composiciones generadas por la presente invención pueden ser útiles al proporcionar métodos para la prevención, inhibición, o reducción de la severidad de la enfermedad de injerto contra huésped o rechazo del injerto en un animal que requiere un trasplante de órganos, que comprende administrar a un animal una cantidad efectiva de las composiciones de células T del sujeto que han sido aclaradas de subpoblaciones de células T alorreactivas indeseadas. Las composiciones pueden administrarse en combinación con otras terapias para el tratamiento de defectos inmunes asociados con el trasplante de órganos.

[0169] La administración de las composiciones farmacéuticas en cuestión puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, que incluye inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, por inyección intravenosa (iv), intratumoral, o intraperitoneal. Preferentemente, las composiciones de células T se administran por inyección intravenosa. Las composiciones de células T activadas pueden inyectarse directamente en un tumor o un ganglio linfático.

En aun otra modalidad, la composición farmacéutica puede distribuirse en un sistema de liberación controlada. Se puede usar una bomba (ver Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Sefton 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald y otros, 1980; Surgery 88:507; Saudek y otros, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). Pueden usarse materiales poliméricos (ver Medical Applications of Controlled Release, 1974, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla.; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, 1984, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York; Ranger y Peppas, 1983; J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; ver además Levy y otros, 1985, Science 228:190; During y otros, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard y otros, 1989, J. Neurosurg. 71:105). Un sistema de liberación controlada puede colocarse próximo al blanco terapéutico, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (ver, *por ejemplo*, Medical Applications of Controlled Release, 1984, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., vol. 2, págs. 115-138).

Las composiciones de células T y/o composición sensibilizante pueden administrarse además usando cualquier número de matrices. Las matrices se han utilizado durante varios años dentro del contexto de la ingeniería de tejidos (ver, *por ejemplo*, Principles of Tissue Engineering (Lanza, Langer, and Chick (eds.)), 1997. Las matrices pueden usarse dentro de un contexto novedoso para actuar como un órgano linfoide artificial para apoyar, mantener, o modular el sistema inmune, típicamente a través de la modulación de células T. En consecuencia, se puede utilizar esas composiciones de matriz y formulaciones que demostraron utilidad en la modificación de tejidos.

En consecuencia, el tipo de matriz que puede usarse en las composiciones, dispositivos y métodos es virtualmente ilimitado y puede incluir tanto matrices biológicas como sintéticas. En un ejemplo particular, se usan las composiciones y dispositivos que se exponen en las patentes de Estados Unidos núms.: 5,980,889; 5,913,998; 5,902,745; 5,843,069; 5,787,900; o 5,626,561. Las matrices comprenden características asociadas comúnmente con ser biocompatibles cuando se administran a un huésped mamífero. Las matrices pueden estar formadas tanto de materiales naturales como sintéticos. Las matrices pueden ser no biodegradables en los casos en que se desea dejar una estructura permanente o estenosis extraíbles en el cuerpo de un animal, tal como un implante; o biodegradables. Las matrices pueden tomar la forma de esponjas, implantes, tubos, almohadillas de Telfa, fibras, fibras huecas, componentes liofilizados, geles, polvos, composiciones porosas, liposomas, células, o nanopartículas. Adicionalmente, las matrices pueden diseñarse para permitir la liberación sostenida de las células sembradas o la citocina producida u otro agente activo. La matriz puede ser flexible y elástica, y puede describirse como un andamio semisólido que es permeable a sustancias tales como sales inorgánicas, fluidos acuosos y agentes gaseosos disueltos que incluyen el oxígeno.

En la presente descripción se usa una matriz como ejemplo de una sustancia biocompatible. Siempre que aparezca el término matriz o matrices la lectura de estos términos debe incluir dispositivos y otras sustancias que permiten la retención celular o el cruce celular, que son biocompatibles, y que son capaces de permitir el cruce de macromoléculas tanto directamente a través de la sustancia de tal manera que la propia sustancia es una membrana semi-permeable, como usarse junto con una sustancia semi-permeable en particular.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

EJEMPLO 1

SUPRESIÓN DE CÉLULAS T ANTÍGENO ESPECÍFICAS DESPUÉS DE LA RE-ESTIMULACIÓN CON PERLAS CD3/CD28 XCELLERATE™

Este ejemplo describe la eliminación de células T antígeno específicas de una población mixta de células por re-estimulación con perlas anti CD3/CD28 XCELLERATE™ (perlas 3x28). La generación de células T XCELLERATED™ usando los procesos descritos en la presente es esencialmente como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 10/133, 236.

Se tamizaron PBMC humanas para positividad a HLA-A2 CMVpp65 por citometría de flujo usando tetrámeros de HLA-A2 cargados con el péptido CMVpp65 (HLA-A2-CMVpp65). Aproximadamente el 3% de las células T CD3+CD8+ seleccionadas del donante expresaron un TCR específico para HLA-A2-CMVpp65 (Figura 1).

Las PBMC del donante (donante 2) y del donante control (donante 1) se activaron con el antígeno CMV recubriendo perlas paramagnéticas y hacia el día 10 del cultivo, muchas células mostraron ser CD25 (IL-2R) positivas mediante análisis de citometría de flujo, y todas las células T HLA-A2 CMVpp65+ expresaron altos niveles de CD25, lo que indica su activación (Figura 2, panel derecho).

En el día 14 luego de la estimulación primaria, los cultivos o se dejaron sin estimular (Figura 3, paneles A1-A4) o se re-estimularon usando el proceso XCELLERATE™ con perlas 3x28 durante 16 horas (Figura 3, paneles B1-B4). Como se muestra en la Figura 3, el CD25 está regulado positivamente en células re-estimuladas (panel B2), pero las células pre-estimuladas positivas al tetrámero (es decir, específicas al Ag-CMVpp65) fueron suprimidas por la fuerte estimulación secundaria proporcionada por las perlas 3x28 (paneles B3 y B4), mientras que las otras células no se afectaron. Se observaron resultados similares cuando las células se unieron a perlas o se asociaron con células unidas a perlas, se seleccionaron magnéticamente y se colocaron de nuevo en cultivo antes de la re-estimulación con las perlas 3x28. En un estudio adicional, las células se re-estimularon durante 4 días adicionales. Se observó la supresión de las células positivas al tetrámero aún después de los 4 días adicionales en los cultivos re-estimulados con 3x28.

Estos resultados demuestran que las células T activadas específicas del antígeno CMVpp65 que se re-estimulan con perlas 3x28 se eliminan de la población de células, muy probablemente por apoptosis.

EJEMPLO 2

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS

Este ejemplo describe un ensayo ilustrativo para evaluar apoptosis.

Ensayo de fragmentación del ADN: Las células se lisan en 50 µl de tampón de lisis (EDTA 10 mM, Tris 50 mM pH 8, dodecil sulfato de sodio 0.5%, proteinasa K 0.5 mg/ml). Se añade ribonucleasa A (0.5 mg/ml) y los lisados se incuban durante 1 hora a 37°C. Se llevan a cabo dos extracciones con fenol (volúmenes iguales), seguidas de una extracción con cloroformo. El ADN se precipita con dos volúmenes de etanol enfriado en hielo y se incuba a -80°C durante 1 hora. El ADN se sedimenta por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los precipitados se secan al aire durante 30 minutos, se re-suspenden en 50 µl de Tris-EDTA pH 8. El ADN se somete a electroforesis en un gel de agarosa al 1.8% en tampón de corrida TBE 1 X (Tris base 0.05 M, ácido bórico 0.05 M, EDTA disódico 1 mM), de acuerdo con los métodos de Preston, y otros, Cancer Res., 1994, 54, 4214-4223.

EJEMPLO 3

INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS B POR CO-CULTIVO CON CÉLULAS T XCELLERATED™.

Este ejemplo describe la supresión de células B leucémicas en muestras de pacientes con B-CLL por co-cultivo con células T XCELLERATED™.

Las células T XCELLERATED™, generadas esencialmente como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 10/133,236, se co-cultivaron con células leucémicas autólogas no manipuladas de pacientes con B-LLC. Se evaluaron los marcadores de superficie celular CD54, CD80, CD95 (FAS) y CD86, y Anexina/PI (apoptosis) a las 24 y 48 horas mediante citometría de flujo. Se observó que las células T XCELLERATED™ elevaron la expresión de CD95 (FAS) en las

células B leucémicas (Figura 4). Después de 48 horas de co-cultivo con células T XCELLERATED™ de 12 días, las células B leucémicas autólogas muestran un aumento en la expresión de CD95 y la sensibilidad a los anti-FAS como se midió por citometría de flujo (Figura 5). Como se muestra en la Figura 5, la adición de un anticuerpo anti-FAS a las células B:T co-cultivadas condujo a un aumento de la apoptosis en las células B leucémicas. En un estudio adicional, se demostró que las células T crecen mientras que las células B leucémicas se eliminan durante el proceso de XCELLERATE™ (Figura 6).

En resumen, las células T XCELLERATED™ regulan positivamente importantes moléculas efectoras en células B leucémicas, inducen el FAS funcional en células B leucémicas, y pueden conducir a estas células B leucémicas hacia rutas relacionadas con la apoptosis. Las células B leucémicas eran virtualmente indetectables hacia el final del proceso de XCELLERATE™. Por lo tanto, las células T XCELLERATED™ pueden usarse como una composición sensibilizante o una composición pro-apoptótica para la eliminación de células B leucémicas de una población mixta de células.

EJEMPLO 4

LA VARIACIÓN DE LAS RELACIONES PERLA:CÉLULA PUEDE EXPANDIR O SUPRIMIR DE MANERA SELECTIVA LAS CÉLULAS T CD8 DE MEMORIA

Este ejemplo muestra que la relación perla:célula puede tener un efecto profundo sobre la expansión de diferentes poblaciones de células T. En particular, una relación perla:célula alta (3:1 - 10:1) tiende a inducir la muerte en las células T antígeno específicas, mientras que una relación perla:célula inferior (1:1-1:10) conduce a la expansión de las células T antígeno específicas. Además, los datos descritos más abajo muestran que las relaciones perla:célula inferiores conducen a una mejor expansión celular en poblaciones de células policlonales como tal. Así, este ejemplo muestra que las relaciones perla:célula inferiores mejoran la expansión celular en general. Además, este ejemplo demuestra que las perlas en relaciones perla:célula altas descritas en la presente invención pueden usarse como composiciones pro-apoptóticas.

Las células se prepararon y estimularon usando el proceso de XCELLERATE I™ esencialmente como se describe en la solicitud de patente núm. 10/187,467 presentada el 28 de junio de 2002. Brevemente, en este proceso, las células T XCELLERATED™ se producen a partir de un producto de aféresis de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Luego de la toma de la muestra del paciente en el sitio clínico, la aféresis de PBMC se lava y se crioconserva. Después las células se descongelaron, y se colocaron en cultivo a 37°C/5% de CO₂ durante 1 hora para permitir que los monocitos y otras células adherentes se unan a la placa de cultivo. Las células no adherentes se transfirieron a nuevas placas de cultivo para la estimulación de la siguiente manera. Luego de esta etapa de reducción de monocitos, se toma un volumen que contiene un total de 5×10^5 células T CD3⁺ y se unen con 1.5×10^5 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T para iniciar el proceso de XCELLERATE™ (aprox. 3:1 de perlas con relación a células T). La mezcla de células y CD3/CD28 T DYNABEADS® M-450 se incubó después a 37°C, 5% de CO₂ durante aproximadamente 8 días para generar células T XCELLERATED™ para una primera infusión. Las PBMC restantes con reducción de monocitos se crioconservan hasta una segunda o adicional expansión de productos celulares (aproximadamente 21 días más tarde) momento en el que se descongelan, se lavan y luego se toma un volumen que contiene un total de 5×10^8 células T CD3⁺ y se unen con 1.5×10^9 CD3/CD28 T DYNABEADS® M-450 para iniciar el proceso de 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 se expanden. El anticuerpo anti-CD3 usado es el BC3 (XR-CD3, Centro Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) y el anticuerpo anti-CD28 (B-T3, XR-CD28) se obtiene de Diaclone, Besançon, Francia.

Para el experimento descrito más abajo, a los cultivos que contienen células donde se han eliminado las células adherentes, se les añade después perlas en las relaciones perla:célula T mostradas en la Tabla 1. Las perlas usadas en este ejemplo comprendieron las DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T con una relación 1:1 de anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas.

Tabla 1: La variación de las relaciones perla:célula puede expandir o suprimir selectivamente las células T CD8 de memoria

Relación Perla:Célula	Veces de incremento	
	Células T policlonales	células T antígeno-específicas para 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

Los resultados resumidos en la Tabla 1 y mostrados gráficamente en la Figura 7 demuestran que las células T antígeno específicas pueden suprimirse selectivamente mediante el uso de relaciones perla:célula altas y pueden expandirse usando relaciones perla:célula bajas. Se observaron resultados similares con células T CD8 específicas para EBV y específicas para la influenza (resultados no mostrados). Sin estar atados por la teoría, se cree que las células T antígeno específicas son más sensibles a una estimulación adicional. La estimulación con relaciones perla:célula altas proporciona una alta concentración de anticuerpo estimulante, lo que conduce a la sobre-estimulación de las células T antígeno específicas, lo que causa su muerte, por apoptosis o por otros mecanismos. Así, con respecto a esto, las perlas funcionan como una composición pro-apoptótica. El uso de relaciones perla:célula inferiores proporciona una señal de estimulación a las células T antígeno específicas que no las sobre-estimulan, sino más bien inducen una proliferación rápida de estas células. Un aumento en la proliferación se observa además en la población policlonal de células T usando relaciones perla:célula inferiores. Particularmente, los resultados indican que una relación perla:célula de 1:1 es óptima para la expansión de células T policlonales.

Por lo tanto, en este ejemplo, se proporciona evidencia para apoyar el uso de diferentes relaciones perla:célula en dependencia del resultado deseado. Para la expansión de células T antígeno específicas, se prefiere una relación perla:célula inferior. Si el resultado deseado es la supresión de células T antígeno específicas, se prefiere una relación perla:célula superior.

EJEMPLO 5

SUPRESIÓN DE CÉLULAS T ALORREACTIVAS DESPUÉS DE LA RE-ESTIMULACIÓN CON PERLAS CD3/CD28 XCELLERATE™

Este ejemplo describe la supresión de células T alorreactivas después de la re-estimulación con perlas CD3/CD28 XCELLERATE™.

Las PBMC se estimularon durante 3 días con PBMC alogénicas o con la línea celular alogénica linfoblastoide B JY. El día 3, las PBMC estimuladas con PBMC o JY alogénicas se cultivaron después con perlas CD3/CD28 usando el proceso de XCELLERATE™ esencialmente como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 10/350,305, con y sin una selección positiva de 30 minutos con perlas CD3/CD28. Luego del proceso de XCELLERATE™, las células se re-estimularon con PBMC alogénicas o con el antígeno alogénico JY y se midió la regulación positiva de CD25. La re-estimulación con células alogénicas luego del proceso de XCELLERATE™ no condujo a una regulación positiva de la expresión de CD25 (medida mediante análisis de citometría de flujo), lo que indica que las células alorreactivas habían sido suprimidas. Particularmente, la selección positiva de células T CD8+ estimuladas con JY durante el proceso de XCELLERATE™ disminuyó significativamente la alorreactividad. Sin embargo, las células T se mantuvieron competentes para responder a antígenos irrelevantes en cultivos XCELLERATED™ como se demostró por terceras respuestas a las PBMC y JY alogénicas (*por ejemplo*, re-estimulación con PBMC alogénicas del cultivo estimulado con JY o re-estimulación con JY del cultivo estimulado con alo-PBMC).

Así, estos resultados muestran que las células T alorreactivas activadas se suprimen por re-estimulación con perlas CD3/CD28 mientras que las células T policlonales restantes pueden expandirse de manera exponencial para su uso en cualquier aplicación inmunoterapéutica.

Reivindicaciones

1. Un método *ex vivo* para eliminar al menos una porción sustancial de una subpoblación de células T clonales de una población mixta de células T de un individuo, que comprende exponer una población de células, en donde al menos una porción de estas comprende células T, a una o más composiciones pro-apoptóticas o inhibidoras del crecimiento en donde dicha exposición induce apoptosis o la inhibición del crecimiento en al menos una porción sustancial de al menos una población de células T clonales presente en la población mixta de células T; eliminando así al menos una porción sustancial de dicha población de células T clonales de la población mixta de células T; **caracterizado porque** la composición pro-apoptótica o inhibidora del crecimiento comprende un autoantígeno.
2. El método de la reivindicación 1, que además comprende expandir la población mixta de células T restante.
3. Un método *ex vivo* para eliminar al menos una porción sustancial de una subpoblación de células T clonales de una población mixta de células T, que comprende:
 - a. exponer una población de células en donde al menos una porción de estas comprende células T a una o más composiciones que sensibilizan al menos una porción de las células T a una activación o estimulación posterior,
 - b. exponer la población de células a una superficie en donde la superficie tiene unido a ella uno o más agentes que ligan una porción de la superficie celular de al menos una porción de las células T sensibilizadas y estimulan dichas células T sensibilizadas, en donde la exposición de dichas células T sensibilizadas a dicha superficie es por un tiempo suficiente para inducir la apoptosis de dichas células T sensibilizadas;
 eliminando así dichas células T sensibilizadas de la población;
caracterizado porque la composición que sensibiliza comprende un autoantígeno.
4. El método de la reivindicación 3 en donde la etapa (b) comprende además exponer a dicha población de células a dicha superficie por un tiempo suficiente para estimular al menos una porción de las células restantes y en donde al menos dicha porción de las células restantes prolifera.
5. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 4 en donde la población mixta de células restante se expande al exponer dicha población a una superficie, en donde la superficie tiene unido a ella uno o más agentes que ligan una porción de la superficie celular de al menos una porción de las células T restantes y estimula dichas células T restantes.
6. El método de la reivindicación 5 en donde dicha superficie tiene unido a ella un primer agente que liga una primera porción de la superficie celular de una célula T, y la misma o una segunda superficie tiene unido a ella un segundo agente que liga una segunda porción de dicha célula T, en donde dicha ligación por el primer y el segundo agente induce la proliferación de dichas células T.
7. El método de cualquier reivindicación precedente en donde el autoantígeno se selecciona del grupo que consiste de proteína básica de la mielina (MBP), MBP 84-102, MBP 143-168, antígenos de las células de los islotes pancreáticos, colágeno, antígenos de tiroides, Scl-70, ácido nucleico, receptor de acetilcolina, antígeno S, y colágeno tipo II.
8. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la composición pro-apoptótica comprende células alogénicas o xenogénicas.
9. El método de cualquier reivindicación precedente en donde el autoantígeno comprende una o más composiciones seleccionadas del grupo que consiste de: antígenos diana, moléculas de ácidos nucleicos, proteínas o péptidos, y compuestos no proteicos o no polinucleotídicos.
10. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 4 en donde la exposición de dichas células a dicha superficie es durante un tiempo suficiente para aumentar la policlonalidad.
11. El método de la reivindicación 10 en donde el aumento en la policlonalidad comprende un cambio de la monoclonalidad a la oligoclonalidad o a la policlonalidad de la población de células T medido por un perfil espectral de V β , V α , V γ o V δ de al menos un gen de la familia V β , V α , V γ o V δ .

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a la 11 en donde al menos un agente es un anticuerpo o un fragmento de este de unión al antígeno.
- 5 13. El método de la reivindicación 6 en donde el primer agente es un anticuerpo o un fragmento de este de unión al antígeno, y el segundo agente es un anticuerpo o un fragmento de este de unión al antígeno.
14. El método de la reivindicación 13, en donde los agentes primeros y segundos son anticuerpos diferentes.
- 10 15. El método de la reivindicación 13 o la reivindicación 14 en donde el primer agente es un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD2, o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-CD3 o anti-CD2.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a la 15, en donde el segundo agente es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de este de unión al antígeno.
- 15 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a la 16, en donde el primer agente es un anticuerpo anti-CD3 y el segundo agente es un anticuerpo anti-CD28.
18. El método de cualquier reivindicación precedente, que además comprende la formulación de la población de células T así generada para su uso terapéutico.
- 20 19. El método de la reivindicación 3 en donde la composición que sensibiliza comprende los PBMC del receptor que se trataron de manera que no sean capaces de continuar dividiéndose y la población de células T comprende células T del donante.
- 25 20. El método de la reivindicación 3 en donde la composición que sensibiliza comprende células del donante que se trataron de manera que no sean capaces de dividirse y la población de células comprende células T del receptor.

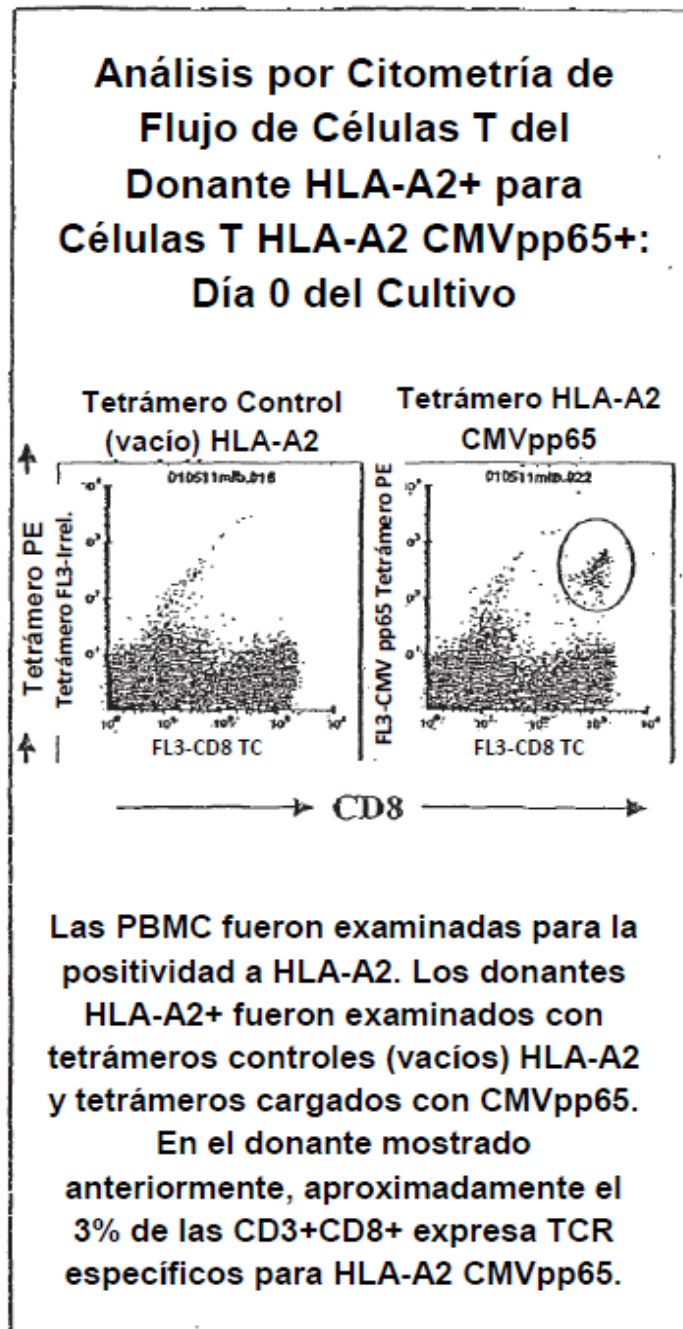
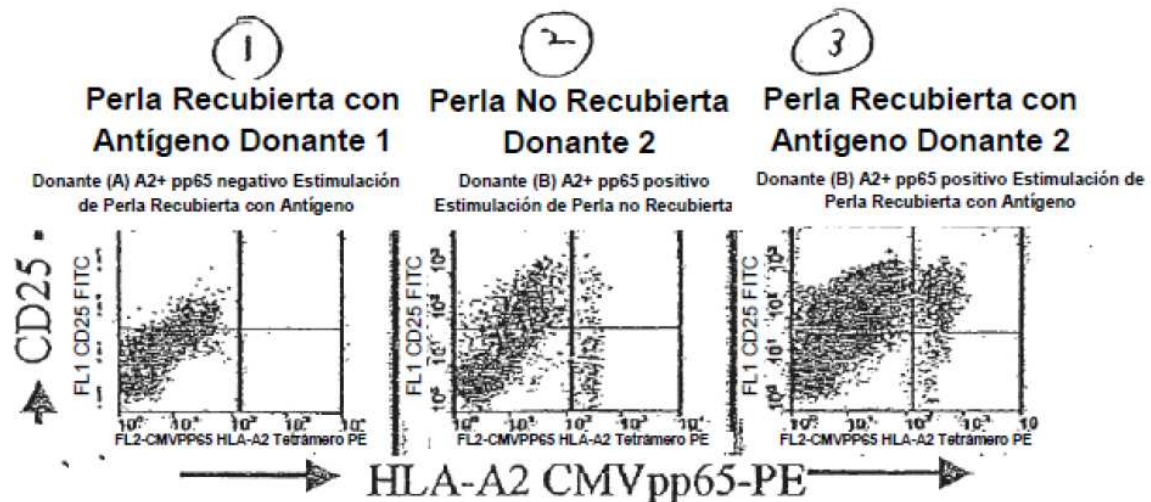


FIG. 1

Análisis por Citometría de Flujo de la Expresión de CD25 en Células T HLA-A2 CMVpp65+: Día 10 del Cultivo



(Tinción de tetrámero cerrada en células T CD8+)

Las PBMC se activaron con antígeno CMV (recubierto en perlas paramagnéticas) y cerca del día 10 de cultivo, muchas células se muestran como CD25 (IL-2R) positivas, y todas las células T HLA-A2 CMVpp65+ expresan altos niveles de CD25, indicando activación (panel derecho). Los controles incluyen las mismas células del donante tratadas con perlas no recubiertas (antígeno negativas) (panel central), o un donante HLA-A2+ (donante 1) que no mostró células tetrámero+ detectables el día 0 y fue serológicamente negativo para CMV (panel de la izquierda). Estos datos indican que las aproximaciones de tetrámeros pueden utilizarse efectivamente para rastrear células T antígeno específicas y su estado relativo de activación.

FIG. 2



La mezcla de Células T Xcellerated con Células leucémicas autólogas B-CLL resulta en la rápida regulación positiva de moléculas efectoras inmunológicas claves. Día 12 Células T Xcellerated co-cultivadas por 24 horas con células B leucémicas autólogas

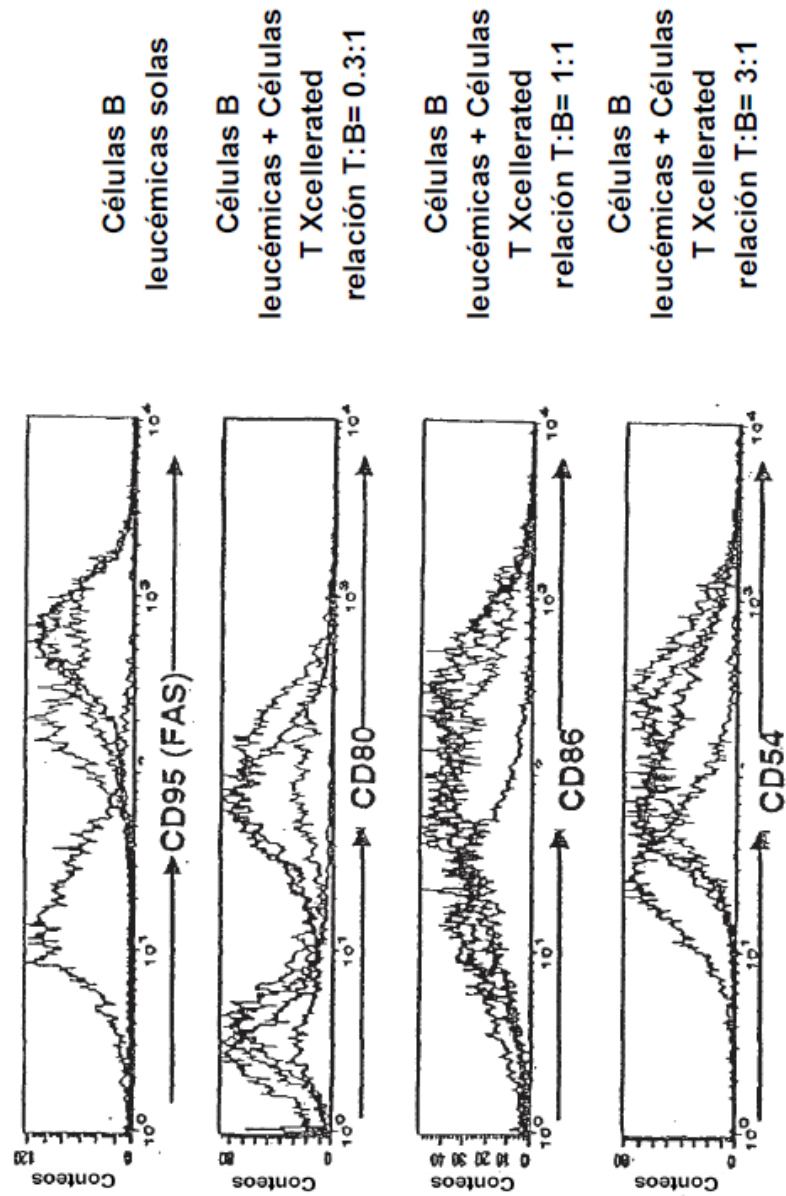


FIG. 4

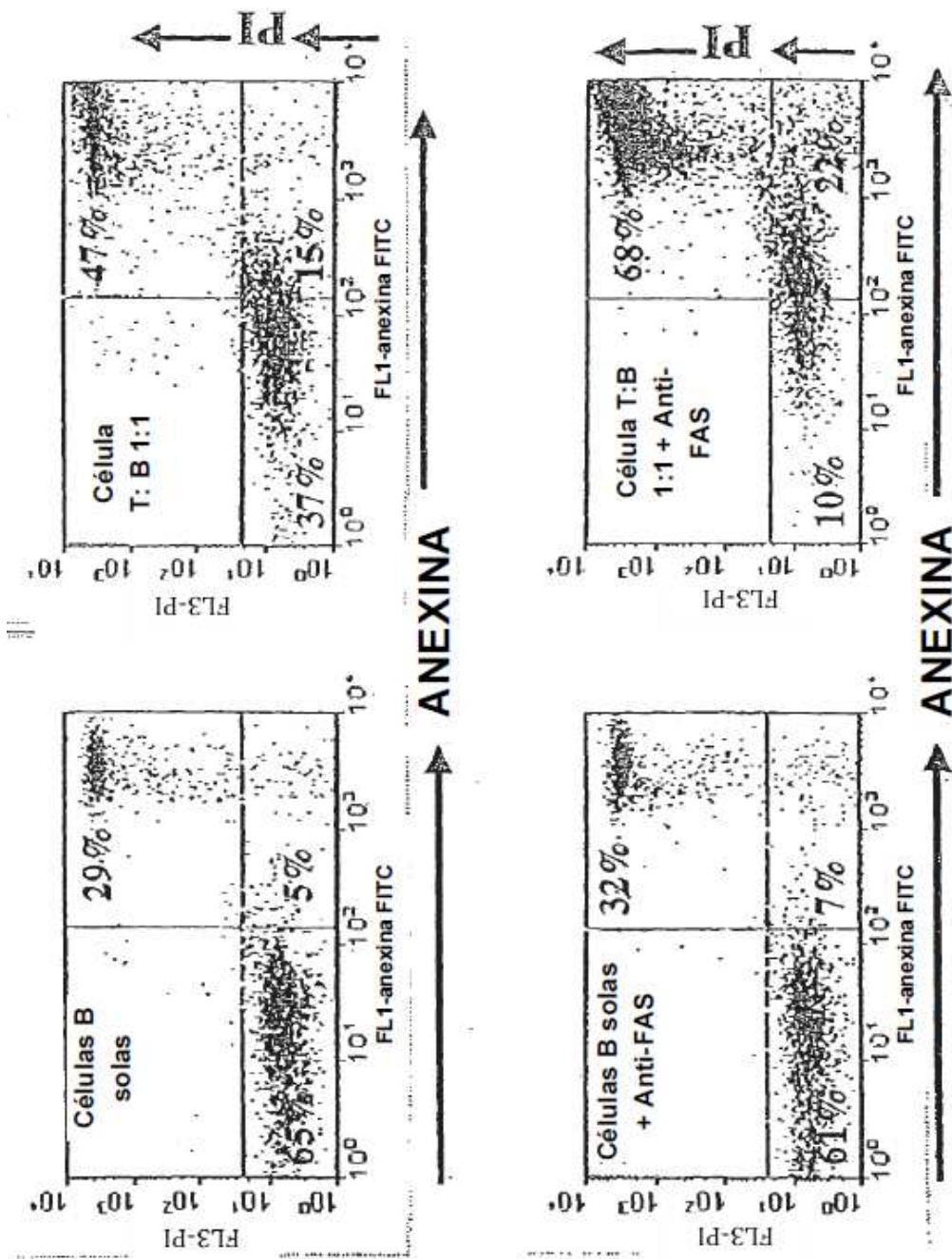


FIG. 5

Las células T crecen y las células tumorales se eliminan durante el proceso Xcellerate

Leucemia linfocítica crónica

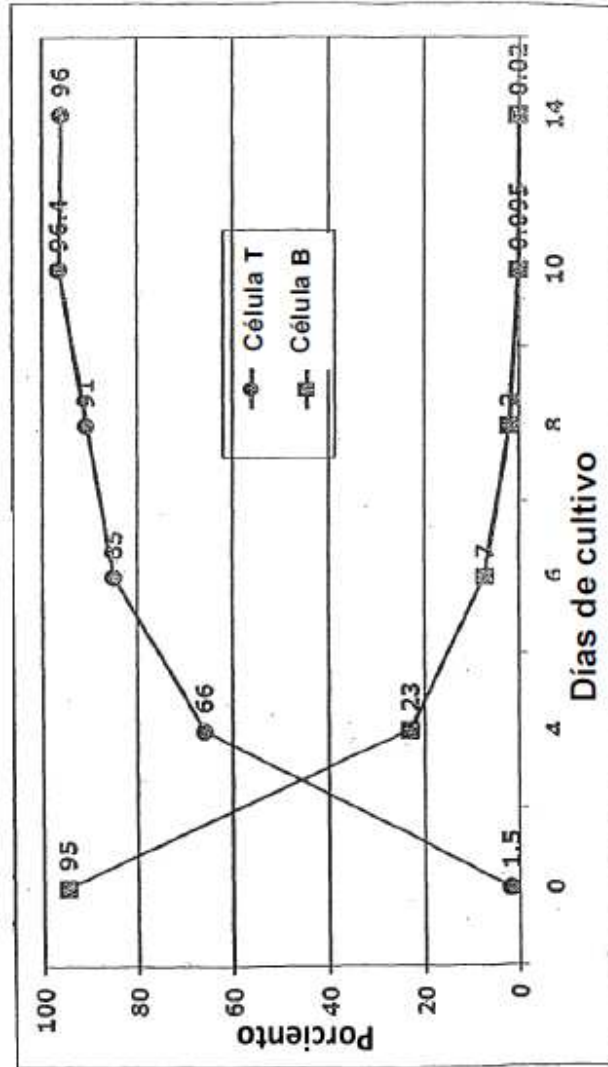


FIG. 6

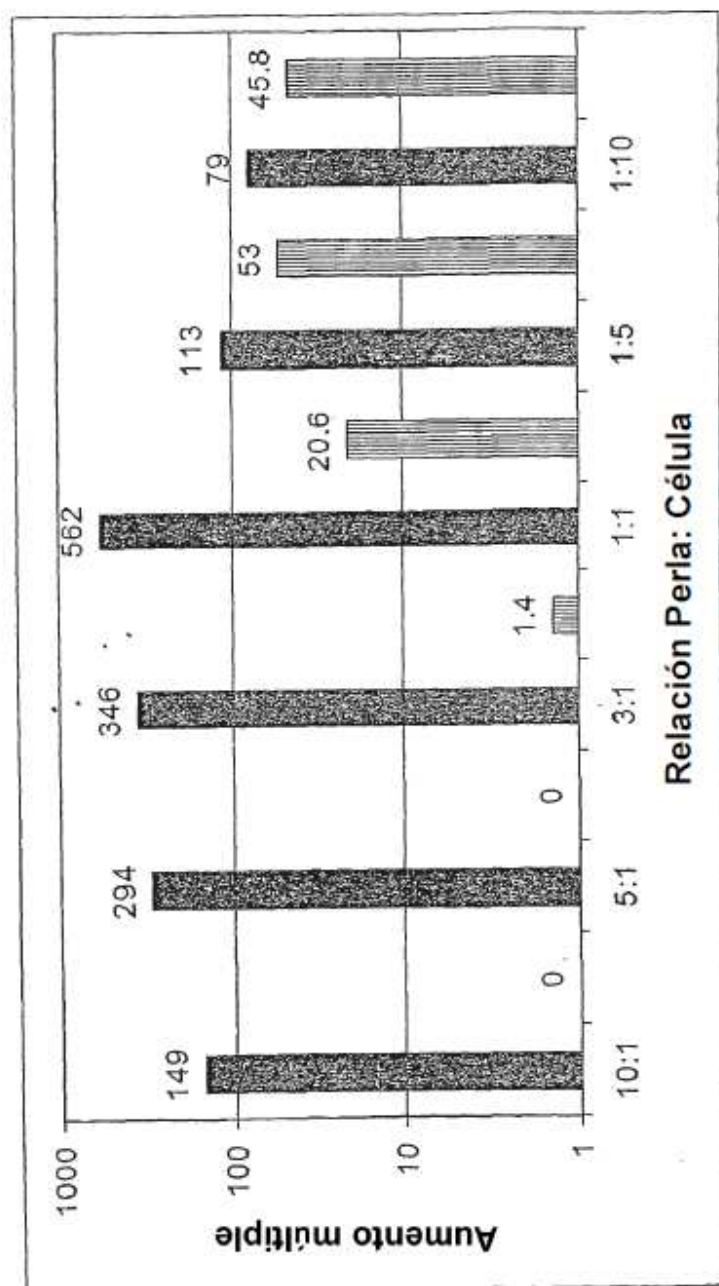


FIG. 7