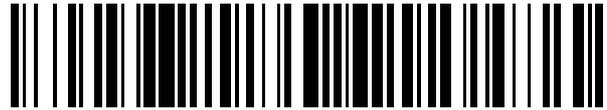


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 916**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2002 E 02768796 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1434856**

54 Título: **Activación y expansión de células**

30 Prioridad:

**20.09.2001 US 960264**

**26.04.2002 US 133236**

**28.06.2002 US 187467**

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

**18.12.2013**

73 Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)**

**5791 VAN ALLEN WAY**

**CARLSBAD, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**BERENSON, RONALD;**

**LAW, CHE;**

**BONYHADI, MARK;**

**SAUND, NARINDER;**

**CRAIG, STEWART;**

**HARDWICK, ALAN R.;**

**KALAMASZ, DALE;**

**MCMILLEN, DAVID y**

**CHANA, HARJINDER SINGH**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 434 916 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

Activación y expansión de células.

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere generalmente a métodos para estimular y activar células, y más particularmente, a métodos para activar y expandir las células a densidades muy altas y para expandir las células a números muy altos.

Descripción de la técnica relacionada

15 El receptor de antígeno de la célula T (TCR) es un receptor multisubunitario de reconocimiento que 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.

20 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, *Immuno/*. 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.

25 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.

30 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<sup>+</sup>. Se cree que se requieren ambas señales de APC para la activación óptima de células T, la expansión, y la sobrevivencia a largo plazo de las células T después de la re-  
35 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  
40 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.

45 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.

50 Adicionalmente, los métodos actualmente disponibles en la técnica 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. Además, la aplicabilidad de las células T expandidas se ha limitado solamente a pocos estados de enfermedad. Para una máxima efectividad *in vivo*, teóricamente, una población de células T activadas, generadas *ex vivo* o *in vivo*  
55 debe estar en un estado que pueda orquestar al máximo una respuesta inmune al cáncer, enfermedad infecciosa, u otros estados de enfermedad. La presente invención proporciona métodos para generar un mayor número de células 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.

60 Adicionalmente, la presente invención proporciona composiciones de poblaciones celulares de cualquier célula diana, que incluyen las poblaciones de células T y los parámetros para la producción de las mismas, así como también para proporcionar otras ventajas relacionadas.

## BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

65 La presente invención proporciona métodos para activar y expandir una población de células T mediante la ligación

de una porción de superficie celular, que comprende: a ) una población de células; b. poner en contacto dicha población de células con una superficie, en donde dicha superficie tiene unida a ella un primer agente que liga una primera porción de superficie de la célula T y un segundo agente que liga una segunda porción de superficie de la célula T, en donde dicha ligación por el primer y segundo agente induce la proliferación de dichas células T y en donde dicho primer agente es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo de este, y dicho segundo agente es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de este, c. expandir dichas células en un sistema cerrado, en donde dichas células se expanden a una concentración de entre  $6 \times 10^6$  células/ml y  $90 \times 10^6$  células/ml en menos de dos semanas, en donde dicho sistema cerrado comprende un recipiente de cultivo biorreactor posicionado en una plataforma oscilante, en donde la oscilación de dicha plataforma se inicia en aproximadamente el día 3 a aproximadamente 5 a 15 oscilaciones/minuto y en donde la velocidad y el ángulo de dicha plataforma oscilante son variables. En una modalidad, las células T se derivan de un único individuo y las células T se expanden a partir de un número de células de partida de aproximadamente  $100-500 \times 10^6$  hasta un total de aproximadamente  $100-500 \times 10^9$  células en menos de aproximadamente dos semanas. El método de la reivindicación 1 en donde dichas células T alcanzan una concentración de aproximadamente  $50 \times 10^6$  células/ml en menos de dos semanas. En una modalidad, las células T alcanzan una concentración de  $40-60 \times 10^6$  células/ml del día 7 al día 12. En una modalidad adicional, las células T se expanden por lo menos aproximadamente 1.5 veces en aproximadamente 24 horas desde aproximadamente el día 5 a aproximadamente el día 12. En otra modalidad, la población de células T se siembra en un recipiente de cultivo que retiene de aproximadamente un volumen de 0.1 litros a aproximadamente un volumen de 200 litros. En una modalidad relacionada, el recipiente de cultivo comprende al menos un filtro de entrada y un filtro de salida. En aún otra modalidad, la población de células T se siembra a una concentración inicial de  $0.2 \times 10^6$  células/ml a  $5 \times 10^6$  células/ml.

En una modalidad, la expansión de las células de la presente invención se produce en un sistema cerrado. En una modalidad, el sistema cerrado comprende un recipiente que comprende al menos un filtro de entrada, un filtro de salida, y un puerto de muestreo. En otra modalidad, el medio de cultivo se perfunde a través del sistema cerrado. En ciertas modalidades, la perfusión se inicia aproximadamente en los días 4-8 a una velocidad de aproximadamente 0.5 ml/minuto a aproximadamente 3 ml/minuto. Los medios ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20. En modalidades adicionales, el medio puede comprender una citocina, tal como IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-12, TGF $\beta$ , y TNF- $\alpha$ , o una vitamina. En modalidades adicionales, el medio comprende surfactante, un anticuerpo, plasmanato o un agente reductor (por ejemplo, N-acetil-cisteína, 2-mercaptoetanol).

En otras modalidades, la plataforma comprende además un elemento térmico variable, un imán, y un distribuidor de gas. En ciertas modalidades, el sistema cerrado comprende además una bomba de jeringa y un control para la transferencia estéril hacia y desde dicho sistema cerrado.

La presente invención proporciona además las poblaciones de células T producidas de acuerdo con los métodos descritos en la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención describe métodos para la expansión de una población de células mediante la ligación de una porción de superficie celular, que comprende: proporcionar una población de células; poner en contacto dicha población de células con una superficie, en donde dicha superficie tiene unida a ella uno o más agentes que ligan una porción de superficie celular de al menos una parte de las células y estimula dichas células, y en donde dichas células se expanden hasta una concentración de aproximadamente entre  $6 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $90 \times 10^6$  células/ml en menos de aproximadamente dos semanas. En ciertas modalidades de los métodos, al menos una parte de dicha población de células comprende células B, células NK, células dendríticas, células madre, células del hígado, neuronas, células mesenquimales, células LAK, o células del pulmón.

Otro aspecto de la presente invención describe métodos para la expansión de una población de células T mediante la ligación de una porción de superficie celular, que comprende: proporcionar una población de células en donde al menos una parte de esta comprende células T; poner en contacto dicha población de células con una superficie, en donde dicha superficie tiene unido a ella un primer agente que liga una primera porción de 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 segundo agente induce la proliferación de dicha célula T; después ponerse en contacto con dicha superficie durante un período de tiempo de aproximadamente entre 0 y 5 días, sembrar dicha población de células a una concentración de entre aproximadamente  $0.2 \times 10^6$  y  $5.0 \times 10^6$  células/ml en un sistema cerrado que comprende una bolsa de biorreactor desechable que comprende al menos un filtro de entrada y un filtro de salida; perfundir el medio a través de dicho sistema cerrado a aproximadamente 1 ml/minuto; oscilar dicha bolsa de biorreactor en una plataforma oscilante a aproximadamente 5-15 oscilaciones/minuto, y en donde dichas células T se expanden a una concentración de aproximadamente entre  $6 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $90 \times 10^6$  células/ml en menos de aproximadamente dos semanas.

La presente invención describe además las poblaciones de células T en donde dichas células T están proliferando y en donde dicha población está a una concentración de entre aproximadamente  $6 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $90 \times 10^6$  células/ml. En una modalidad, la población de células T alcanza un número total de células de entre aproximadamente  $100 \times 10^9$  y aproximadamente  $500 \times 10^9$  en menos de 2 semanas en cultivo.

Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos anexados.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico que compara los números totales de células T activadas y expandidas medidos en el día 8 que parten de aproximadamente  $0.5 \times 10^9$  células T con (XCELLERATE II™) o sin concentración magnética y estimulación (XCELLERATE I™).

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

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

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

Las Figuras 5A-5B son gráficos que describen la activación y expansión de células T con PBMC XCELLERATE I™ (5A) o PBMC después de haber sido congeladas y descongeladas (5B) para iniciar el proceso XCELLERATE I™.

20 Las Figuras 6A-6B son gráficos que describen el análisis del transcurso temporal de la expresión de CD25 después de la activación de las células T en una muestra de donante (PC071) durante el proceso XCELLERATE I o II™. La re-estimulación se realizó en la marca de 8 días para simular la activación *in vivo*. La Figura 6A, describe la expresión de CD25 en células CD4<sup>+</sup>, mientras que la Figura 6B describe la expresión de CD25 en células CD8<sup>+</sup>.

25 Las Figuras 7A-7B son gráficos que describen el análisis del transcurso temporal de la expresión de CD154 después de la activación de las células T en una muestra de donante (PC071) durante el proceso XCELLERATE I o II™. La re-estimulación se realizó en la marca de 8 días para simular la activación *in vivo*. La Figura 7A, describe la expresión de CD154 en células CD4<sup>+</sup>, mientras que la Figura 7B describe la expresión de CD154 en células CD8<sup>+</sup>.

30 Las Figuras 8A y 8B son gráficos que ilustran el crecimiento de células T de sangre periférica humana después de la estimulación con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 y anti-CD28 con el uso del proceso que se expone en el Ejemplo IX.

35 La Figura 9 es un gráfico que ilustra el crecimiento de células T de sangre periférica humana después de la estimulación con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 y anti-CD28 +/- IL-2 humana recombinante a 10 U/ml y +/- la reducción de monocitos. Todas las células se cultivaron en frascos Baxter Lifecell (300 ml). El escalado se refiere a un cultivo en frasco de 300 ml (sin IL-2/reducción de monocitos) que se ha expandido a un frasco Baxter Lifecell de 3 litros.

La Figura 10 es un gráfico que demuestra el análisis cinético del tamaño celular como se determina mediante los perfiles temporales de dispersión frontal de citometría de flujo.

40 Las Figuras 11 A y 11 B son gráficos que representan la expresión de CD25 en el tiempo después de la estimulación inicial con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 y anti-CD28. La Figura 11 A representa el perfil de expresión de CD25 en células CD4<sup>+</sup>, mientras que la Figura 11 B representa el perfil de expresión de CD25 en células CD8<sup>+</sup>.

La Figura 12 es un gráfico que ilustra los cambios en el tamaño celular como se determina mediante los perfiles temporales de dispersión frontal de citometría de flujo después de la estimulación primaria y secundaria.

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

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

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

Las Figuras 16A y 16B son gráficos de datos de citometría de flujo que representan la expresión de CD54 después de la estimulación secundaria, en donde se variaron las fuentes de estimulación secundaria. La Figura 16A

representa la expresión de CD54 en células CD4<sup>+</sup>, mientras que la Figura 16B representa la expresión de CD54 en células CD8<sup>+</sup>.

5 Las Figuras 17A-17D son gráficos de datos de citometría de flujo que representan fenotipos celulares, así como también la expresión de CD154 y CD137 después de la estimulación secundaria mediante perlas acopladas con anti-CD3 y anti-CD28 de las células T obtenidas a partir de un paciente con leucemia linfocítica crónica de células B. Las Figuras 17A y 17B representan células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> presentes en las muestras 13 días posteriores a la estimulación con perlas acopladas con anti-CD3 y anti-CD28 (17A) y 18 días posteriores a la estimulación primaria y 7 días posteriores a la estimulación secundaria con perlas acopladas con anti-CD3 y anti-CD28 (17B). Las Figuras 17C y 17D son gráficos de datos de citometría de flujo que representan la expresión de CD154 y CD137 después de la estimulación secundaria de células obtenidas a partir de un paciente con leucemia linfocítica crónica de células B.

10 Las Figuras 18A-18C son gráficos que representan la expresión en el tiempo de IL-2 (18A), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (18B), e IL-4 (18C) después de la estimulación primaria y secundaria de células T de donantes normales.

Las Figuras 19A-19B son gráficos que representan la expresión en el tiempo de CD62L después de la estimulación con perlas acopladas con anti-CD3 y anti-CD28.

15 La Figura 20 es un gráfico que describe el porcentaje de células CD4 o CD8 después de la estimulación con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 y anti-CD28.

Las Figuras 21 A-21 B son gráficos que representan los datos de citometría de flujo como una función de la intensidad de fluorescencia media de la expresión de CD25 y CD154, respectivamente después de la estimulación con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 y anti-CD28 y +/- re-estimulación con el uso del proceso en el Ejemplo IX

20 Las Figuras 22A-22B son gráficos que representan los análisis de citometría de flujo de la tinción de CD154 contra la tinción control (*por ejemplo*, fondo) en células con ambas subpoblaciones CD8 y CD4 (22A) o poblaciones enriquecidas en CD4 (22B), antes de la estimulación con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 y anti-CD28.

Las Figuras 23A-23B son gráficos que representan el análisis ELISA de TNF- $\alpha$  (23A) e IFN- $\gamma$  (23B) en los medios después de la estimulación de linfocitos de sangre periférica con perlas co-inmovilizados con anti-CD3 y anti-CD28.

25 Las Figuras 24A-24B son gráficos que representan el análisis de ELISA de IL-4 (24A) e IL-2 (24B) en los medios después de la estimulación de linfocitos de sangre periférica con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 y anti-CD28.

La Figura 25 es un gráfico que describe el aumento en el tamaño de las células T después de la estimulación de linfocitos de sangre periférica con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 y anti-CD28 y con el uso del análisis de dispersión frontal.

30 Las Figuras 26A-26L son gráficos de barras que representan los datos de citometría de flujo de la expresión de CD62L (intensidad de fluorescencia media, MFI) (26A), CD49d (MFI) (26B), CD25 (MFI) (26C), CD69 (MFI) (26D), CD154 (MFI) (26E), dispersión frontal de la luz (tamaño) (26F), viabilidad (% ventana viva) (26G); todo después de la estimulación con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 y anti-CD28 y re-estimulación con las mismas en el día 8. Las Figuras 26H-26L describen CD62L, CD69, CD49d, CD154, y CD25 a las 4 y 18 horas posteriores a la estimulación, respectivamente.

35 La Figura 27 es un gráfico que describe las veces que se incrementan las células T en el tiempo después de la estimulación con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 y anti-CD28 con relaciones variables de CD3:CD28.

La Figura 28 es un gráfico que compara la expansión de las células T en un sistema estático con la expansión de las células T en el biorreactor Wave.

40 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.

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

50 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 posteriormente 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 positivamente o regular negativamente la expresión o la secreción de una molécula, tal como la regulación negativa de TGF- $\beta$ . Así, la ligación de porciones de la superficie celular, aún en

ausencia de un evento directo de transducción de la señal, puede resultar en la reorganización de las estructuras del citoesqueleto, o en la coalescencia de porciones de la superficie celular, cada uno de los que podrían servir para mejorar, modificar, o alterar las respuestas celulares posteriores.

5 El término "activación", como se usa en la presente se refiere al estado de una célula después de una ligación suficiente de la porción de superficie celular para inducir un cambio morfológico o bioquímico notable. En el contexto de las células T, tal activación se refiere al estado de una célula T que ha sido suficientemente estimulada para inducir la proliferación celular. La activación de una célula T puede inducir además la producción de citocinas y el desempeño de las funciones reguladoras o efectoras citolíticas. En el contexto de otras células, este término infiere regulación ya sea ascendente o descendente de un proceso físico-químico en particular.

10 El término "fuerza", como se usa en la presente, se refiere a una fuerza artificial o externa aplicada a las células para estimularlas que induce la concentración celular y la concentración de células con el agente que se une a una porción de superficie celular. Por ejemplo, el término "fuerza" incluye cualquier fuerza mayor que la gravedad (*es decir*, adicionalmente a la gravedad y no la fuerza gravitacional únicamente) que induce la concentración de células y/o la agregación de las porciones de superficie celular. Estas fuerzas incluyen la presión transmembrana tal como la filtración, una fuerza hidráulica, una fuerza eléctrica, una fuerza acústica, una fuerza centrífuga, o una fuerza magnética. De manera ideal, la fuerza utilizada impulsa la concentración de la célula diana de interés con un agente que liga una porción de superficie celular. En diversos contextos, la fuerza puede pulsarse, *es decir*, aplicarse y volverse a aplicar (*por ejemplo*, una fuerza magnética puede apagarse y encenderse, pulsando la población de células en combinación con una partícula paramagnética).

25 El término "simultáneo", como se usa en la presente, se refiere al hecho de que inherentemente tras concentrar las células en una superficie que tiene agentes de unión a porciones de la superficie celular unidos a ella, resulta en la concentración de las células entre sí y con la superficie, por lo tanto ligandos (*es decir*, agentes). Sin embargo, el uso del término "simultáneo" no excluye la unión anterior de las células diana con una superficie que tiene agentes de unión a porciones de la superficie celular unidos a ella, como la concentración y la unión adicional del ligando se produce simultáneamente en la superficie de concentración. Por ejemplo, en el contexto de la activación de células T, las células T pueden estar expuestas a una superficie tal como una perla paramagnética que tiene anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a ella y se concentran posteriormente mediante un campo magnético. Así, en este contexto si bien las células y las perlas tienen contacto y ligación previos, sin embargo, durante la concentración de las células se produce ligación adicional.

35 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.

40 Un "anticuerpo", como se usa en la presente, incluye los anticuerpos policlonales y monoclonales; 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)<sub>2</sub>), 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)<sub>2</sub>, scFv, región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>), región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>), y combinaciones de estos.

45 El término "proteína", como se usa en la presente, incluye proteínas, 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.

50 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.

60 Los términos "agente que se une a una porción de superficie celular" y "porción de superficie celular", como se usan en la presente, se utilizan en el contexto de un par ligando/anti-ligando. En consecuencia, estas moléculas deben verse como un conjunto complementario/anti-complementario de moléculas que demuestran unión específica, generalmente de afinidad relativamente alta (una constante de afinidad, K<sub>a</sub>, de aproximadamente 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>).

65 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 de células T.

Un "par ligando/anti-ligando", como se usa en la presente, se refiere a un conjunto complementario/anti-complementario de moléculas que demuestran unión específica, generalmente de afinidad relativamente alta (una constante de afinidad,  $K_a$ , de aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$ .) Los pares ilustrativos de ligando/anti-ligando son enzima/inhibidor, hapteno/anticuerpo, lectina/hidrato de carbono, ligando/receptor, y biotina/avidina o estreptavidina. En el contexto de la especificación de la presente invención los receptores y otras porciones de superficie celular son anti-ligandos, mientras que los agentes (*por ejemplo*, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos) que reaccionan con los mismos se consideran ligandos.

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

"Reposo", como se usa en la presente, se refiere a un estado celular en donde la célula no está proliferando activamente.

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. Un ejemplo prototípico de una superficie que se usa en la presente invención, es una partícula tal como una perla.

Un aspecto de la presente invención se dirige al sorprendente hallazgo de que la combinación de una fuerza que induce la concentración de las células, la ligación de porciones de superficie celular, y el cultivo de células en un sistema oscilante, cerrado, resulta en una mejora profunda en la activación y expansión de estas células. En el ejemplo prototípico que se expone en la presente invención, se utilizan células T. Sin embargo, un experto en la técnica concluiría fácilmente que la presente invención tiene una amplia aplicabilidad a cualquier tipo celular donde se desea la ligación de porciones de superficie celular o la agregación o donde tal unión conduce a un evento posterior de señalización celular (*por ejemplo*, receptores). Si bien no se desea estar atado por la teoría, la presente invención puede funcionar mediante el aprovechamiento de un fenómeno que implica balsas lipídicas y/o la polarización del receptor. Los fenómenos son similares en que ellos sugieren tanto la iniciación/mejora de la transducción de señales mediante la agregación de balsas lipídicas que comprenden porciones de superficie celular o la transducción mejorada de señales debido a la localización (*es decir*, polarización) de los receptores en uno, o aún varias áreas de una célula. Así, no sólo tal ligación de porciones de superficie celular conduce a la activación celular inesperadamente robusta y la proliferación en las células T, sino que además puede aplicarse para amplificar el evento de transducción de señales de muchos tipos celulares. Además, mientras que todavía no se desea estar ligado por la teoría, la presente invención puede funcionar proporcionando aireación óptima para las células en expansión. Así, la ligación de una porción de superficie celular combinada con aireación a través de medios oscilantes y perfundidos conduce a la activación celular inesperadamente robusta y a la expansión de las células T a densidades y números absolutos inesperadamente altos. En consecuencia, en el contexto de las células T, la presente invención proporciona una variedad de ventajas inesperadas, primero se elimina la necesidad de una etapa separada de reducción de monocitos con el uso de partículas "sin recubrir", simplifica la expansión de las células T al requerir menos transferencias de células y menos reactivos, el aumento del nivel de activación de células T durante el proceso de activación, reduce significativamente el tiempo para alcanzar números adecuados de células para la terapia celular, reduce el tiempo y la mano de obra implicada en el procesamiento de las células, reduce el costo de fabricación, y aumenta la flexibilidad del proceso de programación de los pacientes y las infusiones.

En un aspecto adicional de la presente invención, se describe una primera y una segunda o más superficies que se utilizan con o sin ligandos/agentes unidos a ellas. En este ejemplo, las diversas superficies pueden tener los mismos o diferentes agentes unidos a ellas para la unión de porciones de superficie celular de las células diana. Por ejemplo, una perla paramagnética puede tener fijado a ella un anticuerpo para un receptor en una célula diana y tales perlas pueden mezclarse con una población de células que contienen la célula diana. Además, la población celular puede mezclarse con una segunda o más perlas con los mismos o diferentes agentes de unión a porciones de superficie celular unidos a ella. Tras la concentración inducida por fuerza, las perlas y las células se reúnen en un volumen más pequeño y así se amplifica la señalización. En otro ejemplo, perlas paramagnéticas que tienen un agente específico para un hidrato de carbono u otro tipo no receptor de porción de superficie celular unido a ellas se mezclan con una población de células que contiene la célula diana. Un campo magnético se utiliza después para extraer las células unidas a la perla a otra superficie que tiene agentes de ligación tipo receptor unidos a ella. Así, el agente inductor de transducción de la señal está sobre la segunda superficie. En aún otro ejemplo, un agente que se une a una porción de superficie celular de la célula diana puede unirse a una partícula lo suficientemente grande para ser retenida en una malla o filtro que en sí mismo puede tener ligandos unidos a él.

Como se señaló anteriormente, la presente invención describe métodos para estimular una población celular mediante la unión de porciones sobre las superficies de las células en esa población. Poner en contacto una población celular con un agente (*por ejemplo*, un ligando) que se une a una porción de superficie celular puede estimular a la población celular. El ligando puede estar en solución pero además puede unirse a una superficie. La ligación de porciones de superficie celular, tales como un receptor, generalmente puede inducir una vía de señalización particular. Estudios recientes sugieren que para que se produzca la señalización, deben agregarse

5 concentraciones críticas de balsas lipídicas que contienen los receptores necesarios. En forma de ejemplo, la agregación de balsas puede facilitarse *in vivo* o *in vitro* mediante la fijación de ligandos para porciones particulares de superficie celular a las partículas paramagnéticas, la exposición de las partículas que contienen el ligando a las células, y poco después de eso o simultáneamente la aplicación de una fuerza, tal como un campo magnético para  
 10 ayudar a polarizar las porciones ligadas (*por ejemplo*, receptores) y a concentrar las células en un pequeño volumen. La aplicación de una fuerza magnética concentra las células así como también concentra las células con la superficie que tiene agentes unidos a ella que ligan porciones de superficie celular, así proporcionan un mayor contacto de las células con los ligandos, lo que resulta en una activación acelerada y más potente. Muchas aplicaciones de la presente invención son posibles, por ejemplo, si las células tienen un bajo número y/o receptores  
 15 disfuncionales, el método puede concentrar suficientemente tales receptores en las balsas lipídicas para superar tales defectos y permitir la actividad de señalización adecuada. Un ejemplo de tal corrección del repertorio de superficie celular es en pacientes con ciertos tipos de leucemia, en donde antes de la estimulación de la porción de superficie celular con agentes tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, varios marcadores normales de estas poblaciones celulares son inusualmente bajos, tales como el complejo CD3/TCR. Mediante la estimulación de estas  
 20 poblaciones celulares con agentes tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, los marcadores de superficie celular de estas células retornan a un nivel que parece normal y como tal pueden proporcionar un producto de inmunoterapia más robusto para la terapia del cáncer que proporciona una respuesta inmune más fuerte y rápida cuando se retorna al paciente. En aún otras aplicaciones de esta invención, las células pueden concentrarse y activarse de manera eficiente, lo que incluye la inducción de la polarización del receptor, maximizando así los eventos de señalización del receptor. Tales aplicaciones tienen amplia utilidad que incluye el uso en ensayos de tamizaje dirigidos a receptores o mediante la recolección de balsas celulares en la superficie de una célula para inducir la activación tal como la inducción de la apoptosis por ligación de Fas o moléculas similares en una célula tumoral.

25 En un ejemplo de tales ensayos de tamizaje, se podrían usar células que contienen receptores de proteína G acoplados y ponerlos en contacto con agentes que se unen a ellos, estos agentes están unidos a una superficie que permite la concentración inducida por fuerza. En consecuencia, a medida que los receptores se agrupan el evento de transducción de señal se amplifica. Esto podría ser importante en el estudio de los eventos de transducción de señales que están a muy bajo nivel en los experimentos típicos y así para el tamizaje de compuestos de fármacos que inhiban o modifiquen de alguna manera tales eventos de transducción de señales.

30 Estimulación de una población celular

35 Los métodos de la presente invención se refieren a la estimulación de una célula diana mediante la introducción de un ligando o agente que se une a una porción celular, lo que induce un evento celular. La unión del ligando o agente a la célula puede desencadenar una vía de señalización que a su vez activa particulares cambios fenotípicos o biológicos en la célula. La estimulación de una célula diana mediante la introducción de un ligando o agente que se une a una porción celular como se describe en la presente invención puede regular positivamente o regular negativamente cualquier número de procesos celulares que conducen a particulares cambios fenotípicos o  
 40 biológicos en la célula. La activación de la célula puede mejorar las funciones celulares normales o iniciar funciones celulares normales en una célula anormal. El método descrito en la presente invención proporciona la estimulación al forzar la concentración de las células junto con el ligando o agente que se une a una porción de superficie celular.

45 La naturaleza de la unión de un receptor por un ligando resultará en la multimerización de los receptores, o la agregación/orientación de los receptores, de tal manera que la señalización o respuesta celular es regulada positivamente, regulada negativamente, acelerada, mejorada, o alterada de cualquier otra manera de modo que confiere un beneficio particular, tal como la división celular, la secreción de citocinas, la migración celular, el aumento de la interacción célula-célula, etcétera.

50 Más abajo se dan dos ejemplos que ilustran cómo tal multimerización, agregación, o reorientación controlada de porciones de superficie celular podrían ser de beneficio práctico.

55 En un ejemplo, la activación normal de células T por antígeno y células presentadoras de antígenos por lo general resulta en la agregación de balsas de TCR, la reorganización del citoesqueleto, la polarización de las señales de "activación" y la división celular, por ejemplo. Con el uso de enfoques artificiales, tales como los descritos en la presente invención, en la ausencia de activación "normal" de células T *in vivo*, se podría acelerar, mejorar, o de cualquier otra manera afectar las funciones descritas anteriormente, particularmente a través de la ligación acelerada, controlada, y orientada espacialmente de TCR y CD28. Los beneficios podrían ser la expansión celular *in vitro* mejorada que resulta en números más altos de células infundibles y más robustas para aplicaciones terapéuticas. Particularmente, la presente invención proporciona métodos para la activación y expansión de las  
 60 células T a densidades muy altas (en el intervalo desde  $6 \times 10^6$  células/ml a  $90 \times 10^6$  células/ml) y resulta en la producción de un número muy alto de células (hasta 800 mil millones de células se expanden a partir de un individuo a partir de un número de partida de células de aproximadamente  $0.5 \times 10^9$  células). Otros beneficios podrían ser la "agregación" mejorada del receptor para células con defectos, tales como la densidad de TCR en la superficie celular más baja de lo normal. Igualmente, las aplicaciones *in vivo* podrían ser beneficiosas donde se necesite activar poblaciones específicas de células T, tales como las células T específicas de tumor en los sitios tumorales.

La agregación y la orientación mejoradas del receptor podrían proporcionar una señal de activación de cualquier otra manera difícil de obtener para células T tolerizadas funcionales. Además, tal activación podría usarse en el contexto de las células T antígeno específicas. Con respecto a esto, las células T de un tumor podrían aislarse y expandirse e infundirse en el paciente. Igualmente, las células T expuestas a un antígeno tanto *in vivo* como *in vitro* podrían expandirse mediante las presentes metodologías.

En una modalidad particular de la invención, una población de células T puede estimularse mediante la concentración y ligación simultáneas de las superficies de las células T. En un aspecto de la presente invención, los anticuerpos para CD3 y CD28 se co-inmovilizan sobre una superficie. Una superficie preferida para tal inmovilización incluye partículas, y en ciertos aspectos, perlas, tales como perlas paramagnéticas. En otro aspecto de la presente invención, cualquier ligando que se une al complejo TCR/CD3 e inicia una señal de estimulación primaria puede utilizarse como un agente de activación primaria inmovilizado sobre la superficie. Cualquier ligando que se une a CD28 e inicia la vía de transducción de señales de CD28, que causa así la co-estimulación de la célula con un ligando CD3 y la mejora de la activación de una población de células T, es un ligando de CD28 y en consecuencia, es un agente co-estimulador dentro del contexto de la presente invención. En otro aspecto de la invención, se aplica una fuerza a la mezcla de células T y superficies con anti-CD3 y anti-CD28 conjugados para concentrar las células T, maximizando así la ligación a la superficie de las células T. Mientras que en una modalidad particular, la fuerza de concentración es la fuerza magnética aplicada donde las superficies recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28 son perlas paramagnéticas, otros medios están disponibles en la técnica para reunir las células y los ligandos en una forma concentrada. Tales métodos para estimular una población de células T proporcionan el contacto significativo de perlas-célula y/o célula-célula que induce sorprendentemente una mayor activación y/o proliferación de células T. Además, los métodos de la invención alteran el perfil del marcador de superficie celular en donde la células T activadas expresan marcadores de superficie celular que indican un fenotipo más normal y el producto final menos variable en comparación con el perfil de las células T cuando se aislaron por primera vez a partir de un sujeto con una enfermedad.

#### La señal primaria

Los eventos bioquímicos responsables de la estimulación de células T *ex vivo* se exponen brevemente más abajo. La interacción entre el complejo TCR/CD3 y el antígeno presentado junto con cualquiera de las moléculas de MHC clase I o clase II en una célula presentadora de antígenos inicia una serie de eventos bioquímicos denominados activación de células T antígeno específicas. En consecuencia, la activación de las células T puede lograrse mediante la estimulación del complejo TCR/CD3 de las células T o mediante la estimulación de la proteína de superficie CD2. Un anticuerpo monoclonal anti-CD3 puede usarse para activar una población de células T a través del complejo TCR/CD3. Un número de anticuerpos monoclonales humanos anti-CD3 están comercialmente disponibles, los ejemplos son OKT3, preparado a partir de células de hibridoma obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo, y el 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 además. Los anticuerpos adicionales, o combinaciones de anticuerpos, pueden prepararse e identificarse por técnicas estándar.

Una señal de activación primaria puede enviarse además a una célula T a través de otros mecanismos. Por ejemplo, una combinación que puede usarse incluye un activador de proteína quinasa C (PKC), tal como un éster de forbol (*por ejemplo*, acetato de forbol miristato), y un ionóforo de calcio (*por ejemplo*, ionomicina, que eleva las concentraciones citoplasmáticas de calcio), o similares. El uso de tales agentes evade el complejo TCR/CD3 pero envía una señal estimuladora a las células T. Otros agentes que actúan como señales primarias pueden incluir ligandos naturales y sintéticos. Un ligando natural puede incluir MHC con o sin un péptido presentado. Otros ligandos pueden incluir, pero sin limitarse a, un péptido, un polipéptido, un factor de crecimiento, citocina, quimocina, glicopéptido, receptor soluble, esteroide, hormona, mitógeno, tal como PHA, u otros superantígenos, tetrámeros de péptido-MHC (Altman, y otros, Science. 1996 oct 4,274(5284):94-6.) y dímeros solubles de MHC (Dal Porto, y otros, Proc Natl Acad Sci U S A 1993 jul 15;90). En el contexto de la presente invención, el uso de la concentración y la estimulación puede resultar en una polarización del receptor tan alta que no se requiere señal secundaria para inducir la proliferación de células-T.

En otros ejemplos los eventos de transducción de señales de cualquier tipo pueden amplificarse o analizarse mediante la utilización de la presente invención. Por ejemplo, los receptores acoplados a proteínas G pueden estimularse y medirse con el uso de los métodos de concentración de la presente invención.

#### La señal secundaria

Mientras parece requerirse la estimulación del complejo TCR/CD3 o la molécula CD2 para el envío de una señal de

activación primaria en una célula T, un número de moléculas en la superficie de las células T, denominadas moléculas accesorias o co-estimuladoras, se han implicado en la regulación de la transición de una célula T en reposo a la transformación blástica, y la posterior proliferación y diferenciación. Así, además de la señal de activación primaria, la inducción de respuestas de células T requiere una segunda señal, co-estimuladora. Una de tales moléculas co-estimuladoras o accesorias, CD28, se cree que inicia o regula una vía de transducción de señales que es diferente de cualquiera estimulada por el complejo TCR.

Por lo tanto, para mejorar la activación y la proliferación de una población de células T en ausencia de factores de crecimiento exógenos o células accesorias, una molécula accesoria sobre la superficie de la célula T, tal como CD28, se estimula con un ligando que se une a la molécula accesoria. En una modalidad, la estimulación de la molécula accesoria CD28 y la activación de células T se producen simultáneamente poniendo en contacto una población de células T con una superficie a la que están unidos un ligando que se une a CD3 y un ligando que se une a CD28. La activación de las células T, por ejemplo, con un anticuerpo anti-CD3, y la estimulación de la molécula accesoria CD28 resulta en la proliferación selectiva de las células T CD4<sup>+</sup>.

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 invención incluyen el anticuerpo monoclonal 9.3 (IgG2<sub>a</sub>) (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), anticuerpo monoclonal KOLT-2 (IgG1), 15E8 (IgG1), 248.23.2 (IgM), y EX5.3D10 (IgG2<sub>a</sub>) (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). 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 invención. Otros agentes que actúan como señales secundarias pueden incluir ligandos naturales y sintéticos. Los agentes pueden incluir, pero sin limitarse a, otros anticuerpos o fragmentos de estos, un péptido, polipéptido, factor de crecimiento, citocina, quimocina, glicopéptido, receptor soluble, esteroide, hormona, mitógeno, tal como PHA, u otros superantígenos.

En un otro ejemplo de la invención, la activación de una población de células T puede mejorarse mediante la co-estimulación de otras proteínas integrales de membrana de células T. Por ejemplo, la unión de la integrina de células T LFA-1 a su ligando natural, ICAM-1, puede mejorar la activación de las células. Otra molécula de superficie celular que puede actuar como un co-estimulador de las células T es la VCAM-1 (CD106) que se une al antígeno-muy-tardío 4 (VLA-4) en las células T. La ligación de 4-1 BB, un receptor co-estimulador que se expresa en células T activadas, puede ser útil además en el contexto de la presente invención para amplificar la inmunidad mediada por células T.

Un experto en la técnica apreciará que las células que no sean células T pueden estimularse mediante la unión de un agente que liga una porción de superficie celular e induce la agregación de la porción, lo que a su vez resulta en la activación de una vía de señalización. Otras tales porciones de superficie celular incluyen, pero sin limitarse a, receptor de folato anclado a GPI (CD59), receptor de IgE humano (receptor FcεRi), BCR, receptor de EGF, receptor de insulina, receptor de efrina B1, neurotrofina, factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), proteínas hedgehog y otras entrecruzadas al colesterol y palmitoiladas, H-Ras, integrinas, óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), FAS, los miembros de la familia del receptor de TNF, proteínas ancladas a GPI, proteínas doblemente aciladas, tal como las quinasas de la familia Src, la subunidad alfa de las proteínas G heterotriméricas y proteínas del citoesqueleto.

#### Expansión de las poblaciones de células T

En un aspecto de la presente invención, la expansión de células T *ex vivo* puede realizarse mediante el aislamiento de las células T y su posterior estimulación. En otra modalidad, las células T se estimulan con dos agentes, uno que induce una señal primaria y un segundo que es una señal co-estimuladora. 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. Además, como se señaló anteriormente, una, dos, o más moléculas estimuladoras pueden usarse en la misma o diferentes superficies.

Antes de la expansión, 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 a partir de un número de fuentes, que incluyen las células mononucleares de sangre periférica, médula

ósea, tejido de ganglio linfático, tejido del bazo, y tumores. En ciertas modalidades de la presente invención, puede usarse cualquier número de líneas de células T disponibles en la técnica. En algunos ejemplos 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 un ejemplo preferido las
   
5 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. 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
   
10 etapas de procesamiento. En un ejemplo de la invención, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En un ejemplo alternativo la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos si no de todos los cationes divalentes. Una vez más, sorprendentemente, las etapas iniciales de activación en ausencia de calcio conducen a la activación amplificada. Como los expertos en la técnica apreciarán fácilmente una etapa de lavado puede lograrse por métodos conocidos por expertos en la técnica, tales como mediante el uso de una centrífuga semi-automatizada de "flujo continuo" (por ejemplo, el procesador celular
   
15 Cobe 2991) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS libre de Ca, y libre de Mg. Alternativamente, los componentes indeseados de la muestra de la aféresis pueden eliminarse y las células resuspenderse directamente en medios de cultivo.

Las células T se aíslan de linfocitos de sangre periférica por lisis de las células rojas de la sangre 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<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, y CD45RO<sup>+</sup>, 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 con anti-CD3/anti-CD28 (*es decir*, 3x28, tales como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, por un
   
25 periodo de tiempo suficiente para la selección positiva de las células T deseadas. En una modalidad, aproximadamente 30 minutos. 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
   
30 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<sup>+</sup>.

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 utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular
   
40 presentes en las células negativamente seleccionadas. Por ejemplo, para enriquecer en células CD4<sup>+</sup> por selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales incluye típicamente anticuerpos para CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, y CD8.

Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, puede variarse la concentración de células y la superficie (*por ejemplo* partículas tales como perlas). En algunas modalidades, se puede desear disminuir significativamente el volumen en donde las perlas y las células se mezclan (*es decir*, aumentar la concentración de las células), para asegurar un contacto máximo de células y perlas. Por ejemplo, en una modalidad, se usa una concentración de 2 mil millones de células/ml. En una modalidad se usa una
   
50 concentración de 1 mil millones de células/ml. En una modalidad adicional, 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 la captura más eficiente de las
   
55 células que pueden expresar débilmente los antígenos diana de interés, tales como células T CD28 negativas, o a partir de muestras donde hay muchas células tumorales presentes (*es decir*, sangre leucémica, tejido tumoral, etcétera). 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<sup>+</sup> 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 las células T y la superficie (*por ejemplo*, partículas tales como perlas), 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<sup>+</sup> expresan altos niveles de
   
60 CD28 y son capturadas de manera más eficiente que las células T CD8<sup>+</sup> en concentraciones diluidas. En una

modalidad, la concentración de células usada es  $5 \times 10^6$ /ml. En otras modalidades, la concentración usada puede ser de  $1 \times 10^5$ /ml a aproximadamente  $1 \times 10^6$ /ml, y cualquier valor entero entre estos.

5 Si se desea o es necesario las poblaciones de monocitos (es decir, células CD14<sup>+</sup>) pueden reducirse de preparaciones de sangre antes de la expansión *ex vivo* mediante una variedad de metodologías, incluyendo perlas o columnas recubiertas con anti-CD14, o la utilización de la actividad fagocítica de estas células para facilitar la eliminación. 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, 10 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 dirigidos 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. 15

En resumen, tal reducción de monocitos se realiza por preincubación de las PBMC que se han aislado a partir de sangre total 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 20 (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. Tal separación puede realizarse usando métodos estándares disponibles en la técnica. 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 técnica, incluyendo análisis de citometría de flujo de células CD14 positivas, antes y después de dicha reducción. 25

Las células T que se estimularán pueden además congelarse después de la etapa de lavado, lo que no requiere de la etapa de reducción de los 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 técnica y serán útiles en este contexto, un método implica el uso de 30 PBS que contiene 20% DMSO y 8% albúmina de suero humano 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. Otros métodos de congelación controlada pueden usarse así como también la congelación inmediata no controlada a -20° C o en nitrógeno líquido. 35

40 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-CD2 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<sup>+</sup> 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. Igualmente, para estimular la proliferación de células T CD8<sup>+</sup>, puede usarse un anticuerpo anti-CD3 y el anticuerpo anti-CD28 B-T3, XR-CD28 (Diacclone, Besançon, Francia) al igual que otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (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). 45 50

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 se acoplan 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"). 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 un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. 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<sup>+</sup> 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 55 60 65

5 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 1:100. 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 1:30. 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 1:3. En aún otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 3:1.

10 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 técnica, 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 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero entre estos, puede usarse además 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 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 a 6:1, con una relación preferida de al menos 1:1 partículas por célula T. 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 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 técnica apreciará que una variedad de otras relaciones puede ser adecuada para usar en la presente invención. Particularmente, las relaciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de la célula.

35 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 12 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.

50 En una modalidad la estimulación de células T se lleva a cabo 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 invención, 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 y el aumento de la producción de citocinas.

60 En modalidades adicionales de la presente invención las células, tales como las células T se combinan con perlas recubiertas 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 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.

65 A modo de ejemplo, cuando las células T son la población de células diana, las porciones de la superficie celular se

5 pueden ligar al permitir que las perlas paramagnéticas, a las que están unidos los anti-CD3 y anti-CD28 (perlas 3x28), se pongan en contacto con las células T. En una modalidad las células (por ejemplo,  $10^4$  a  $10^9$  células T) y perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 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 técnica 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 toda la muestra (*es decir*, 100%) puede comprender la célula diana de interés. En consecuencia, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente invención. En algunas modalidades, se puede desear disminuir significativamente el volumen en donde 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.

25 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  $5 \times 10^6$ /ml. En otras modalidades, la concentración usada puede ser de aproximadamente  $1 \times 10^5$ /ml a aproximadamente  $1 \times 10^6$ /ml, y cualquier valor entero entre estos.

30 El tampón en el que las células están suspendidas puede ser cualquiera que sea adecuado para el tipo particular de célula. Cuando se utilizan ciertos tipos celulares el tampón puede contener otros componentes, *por ejemplo*, 1-5% de suero, necesario para mantener la integridad de la célula 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 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.

40 En una modalidad de la presente invención, la mezcla puede cultivarse por 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. Además 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*, fetal bovino o humano) o interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- $\gamma$ , IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-12, TGF $\beta$ , y TNF- $\alpha$ . o u otros aditivos para el crecimiento de las células, conocidos por el técnico con experiencia. Otros aditivos para el crecimiento de las células incluyen, pero sin limitarse a, surfactante, plasmanato, y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. El medio puede incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -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% CO<sub>2</sub>) adecuadas.

60 Cuando se usa un campo magnético como fuerza concentradora de la intensidad del campo magnético aplicado a las células antes del cultivo celular puede estar en el intervalo de 200 gauss a 12,000 gauss en la superficie magnética. La forma y el tamaño del imán pueden adaptarse al tamaño y la forma de los recipientes de cultivo celular o de mezclado o a cualquier otro parámetro que facilite o aumente el contacto célula a célula y la concentración de las células. La fuerza magnética puede difundirse mediante la colocación de un material que actúa como un tampón o separador entre el imán y las perlas paramagnéticas contenidas dentro de la mezcla con las células. Una fuerza magnética fuerte se considera generalmente que es al menos 7500 gauss en la superficie, mientras que una fuerza magnética débil se considera en el intervalo de 2000 a 2500 gauss en la superficie. La

fuerza magnética aproximada aplicada por un imán sobre una perla paramagnética depende del volumen de la perla paramagnética y la intensidad del campo magnético de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

donde  $F_{mag}$  es igual a la fuerza magnética,  $v$  es igual al volumen de la perla paramagnética,  $\psi$  es igual a la susceptibilidad magnética de una perla paramagnética (un valor que proporciona el fabricante),  $B$  es igual a la intensidad del campo magnético, y  $(dB/dx)$  es igual al gradiente de intensidad del campo. Un experto en la técnica apreciará que los factores en el lado derecho de la ecuación pueden obtenerse o medirse, lo que permite calcular la fuerza magnética aplicada.

Las células estimuladas mediante los métodos de la presente invención se activan como se muestra mediante la inducción de la transducción de señales, la expresión de marcadores de superficie celular y/o la proliferación. Uno de estos marcadores apropiados para las células T es CD154 que es una importante molécula inmunomoduladora. La expresión de CD154 es extremadamente beneficiosa en la amplificación de la respuesta inmune. CD154 interacciona con la molécula CD40 expresada en muchas células B, células dendríticas, monocitos, y algunas células endoteliales. En consecuencia, es probable que este aumento inesperado y sorprendente en la expresión de CD154 conduzca a composiciones de células T más eficaces. La estimulación de células CD3<sup>+</sup> como se describe en la presente invención proporciona células T que expresan incrementos de 1.1 a 20 veces en los niveles de ciertos marcadores de superficie celular tales como la expresión de CD154 en los días 1, 2, 3, o 4 después de la estimulación. (Ver el Ejemplo V, Tabla 2 y Figura 4.) La expresión de otro marcador de superficie celular, CD25, fue mayor además en las células T después de la concentración y estimulación que en las células antes del cultivo o las células estimuladas mediante otros métodos. (Ver la Tabla 2).

Un experto en la técnica apreciará que cualquier célula diana que pueda estimularse mediante ligación de una porción de superficie celular puede combinarse con la superficie recubierta con el agente, tal como perlas. Además, las superficies recubiertas con el agente, tales como perlas, pueden separarse de las células antes del cultivo, en cualquier punto durante el cultivo, o en la terminación del cultivo. Además, las superficies recubiertas con el agente ligadas a las células diana pueden separarse de las células no unidas antes del cultivo o las otras células pueden mantenerse en cultivo. En una modalidad, antes del cultivo, las perlas recubiertas con el agente y las células diana no se separan sino que se cultivan juntas. En una modalidad adicional, las perlas y las células diana se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, lo que resulta en ligación de porciones de la superficie celular, induciendo así la estimulación y la posterior activación.

Además, esta invención contempla otros medios para aumentar la concentración de las células diana, por ejemplo, una fracción de células T unida a una superficie recubierta con moléculas estimuladoras primarias y secundarias. Adicionalmente a la aplicación de una fuerza magnética, pueden aplicarse otras fuerzas mayores que la fuerza gravitacional, por ejemplo, pero sin limitarse a, fuerza centrífuga, presión transmembrana, y una fuerza hidráulica. La concentración puede lograrse además mediante filtración.

Un experto en la técnica apreciará fácilmente que el contacto entre las perlas recubiertas con el agente y las células a estimular puede aumentarse mediante concentración con el uso de otras fuerzas. En consecuencia, cualquier medio para la concentración de las células con ligandos de unión a porciones de superficie celular será suficiente siempre y cuando la concentración reúna a las células y agentes de una manera que supere la gravedad o la difusión.

Debe entenderse que en diversas modalidades la superficie recubierta con el agente puede ser una partícula, tal como una perla que se mezcla con las células y se concentra en un pequeño volumen en un campo magnético, extrayendo así todas las partículas y las células unidas a las partículas hacia un área definida y concentrada. En ciertas modalidades, la superficie recubierta con el agente puede extraerse por la fuerza dentro de los treinta segundos a cuatro horas de la exposición a las células diana. En otras modalidades el tiempo puede ser de 1 minuto a 2 horas, o todos los intervalos de números enteros intermedios. La aplicación de una fuerza a una población de células con células que contienen receptores que se mezcla con una superficie a la que está unido al menos un ligando de la superficie celular puede inducir la polarización del receptor celular, lo que agrega las moléculas de superficie celular. Estos medios para la inducción de la polarización de la superficie celular pueden mejorar la señalización dentro de la célula mediante la agregación de moléculas de la superficie celular que comprenden balsas lipídicas. Tal agregación puede inducir una vía de señalización, que puede conducir a la regulación negativa o supresión de un evento celular. Por otra parte, la agregación de moléculas de la superficie celular puede conducir a la regulación positiva o activación de un evento celular.

Un evento celular puede incluir, por ejemplo, la transducción de señales mediada por receptor que induce o suprime una vía en particular, lo que incluye una vía apoptótica, o induce la fosforilación de proteínas, o estimula o suprime las señales de crecimiento. En una modalidad, las células pueden ser linfocitos, particularmente una célula T, y el ligando de la superficie celular pueden ser un anticuerpo anti-CD3 unido a una superficie, por ejemplo, una partícula. La partícula puede ser una perla paramagnética y la fuerza aplicada una fuerza magnética. La aplicación de una

fuerza magnética a una mezcla de los linfocitos y la superficie de la perla paramagnética recubierta con anti-CD3 puede provocar que los receptores CD3 de la célula T se polaricen más rápidamente de lo que se produciría en ausencia de una fuerza externa. Este método de estimulación de la célula T promueve la activación más rápida de las vías de respuesta inmune de células T y la proliferación de las células.

5 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 para obtener 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  $CD4^+$   
 10 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-  
 15 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,  
 20 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 invención, 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- $\gamma$  o un aumento de la citólisis de una célula diana.

25 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, 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  
 30 modalidad preferida, el periodo del tiempo de incubación es 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.

Para efectuar el aislamiento de diferentes poblaciones de células T, pueden variarse o pulsarse los tiempos de exposición a la fuerza de concentración. Por ejemplo cuando tal fuerza es un imán, pueden variarse la exposición al imán o la intensidad del campo magnético, y/o pueden variarse los tiempos de expansión para obtener el fenotipo  
 35 específico de interés. La expresión de una variedad de marcadores fenotípicos cambia en el tiempo; por lo tanto, puede elegirse un punto de tiempo en particular para obtener una población específica de células T. En consecuencia, dependiendo del tipo de célula a estimular, 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  
 40 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  
 45 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  
 50 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.

55 Las células T que han sido expuestas a varios tiempos de estimulación pueden exhibir características diferentes. Por ejemplo, los productos de células típicas de la sangre o mononucleares de sangre periférica de aféresis tienen una población de células T helper ( $T_H$ ,  $CD4^+$ ) que es mayor que la población de células T citotóxicas o supresoras ( $T_C$ ,  $CD8^+$ ). La expansión *ex vivo* de células T mediante la estimulación de los receptores de  $CD3$  y  $CD28$  produce una población de células T que antes de aproximadamente 8-9 días consiste predominantemente de células  $T_H$ , mientras  
 60 que después de aproximadamente 8-9 días, la población de células T comprende una población incrementada de células  $T_C$ . En consecuencia, dependiendo de la finalidad del tratamiento, puede ser ventajosa la infusión de un sujeto con una población de células T que comprende predominantemente células  $T_H$ . Igualmente, si se aísla un subconjunto de células  $T_C$  antígeno específicas puede ser beneficioso expandir este subconjunto a un mayor grado

65 Además, adicionalmente a los marcadores  $CD4$  y  $CD8$ , otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero

en gran parte, de manera reproducible durante el transcurso del proceso de expansión celular. Así, tal reproducibilidad permite la capacidad de ajustar un producto de células T activadas para fines específicos.

5 En un ejemplo, entre los marcadores fenotípicos importantes que varían de manera reproducible con el tiempo están el receptor de IL-2 de alta afinidad (CD25), el ligando CD40 (CD154), y CD45RO (una molécula que por asociación preferencial con el TCR puede aumentar la sensibilidad del TCR a la unión al antígeno). Como el experto en la técnica apreciará fácilmente, tales moléculas son importantes por una variedad de razones. Por ejemplo, CD25 constituye una parte importante del lazo autocrino que permite la rápida división de células T. Se ha mostrado que CD154 desempeña un papel clave en la estimulación de la maduración de las células dendríticas presentadoras de antígeno; la activación de células B para la producción de anticuerpos, la regulación de la proliferación de las células T<sub>H</sub>; la mejora de la diferenciación de las células T<sub>C</sub>; la regulación de la secreción de citocinas tanto de las células T<sub>H</sub> como las células presentadoras de antígeno; y la estimulación de la expresión de ligandos co-estimuladores, que incluyen CD80, CD86, y CD154.

15 Picos de producción de citocinas en los primeros días del proceso de expansión *ex vivo*. En consecuencia, debido a que se conoce que las citocinas son importantes para la mediación de la activación y la función de las células T así como también para la modulación de la respuesta inmune, tales citocinas son probablemente críticas en el desarrollo de un producto terapéutico de células T, que es capaz de someterse a la reactivación tras ponerse en contacto con un desafío de antígeno adicional. Las citocinas importantes con respecto a esto, incluyen, pero sin limitarse a, IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ . Así, mediante la obtención de una población de células T durante los primeros días de la expansión y la infusión de estas células en un sujeto, puede producirse un beneficio terapéutico en el que se produce la activación y la expansión adicionales de las células T *in vivo*.

25 Adicionalmente a las citocinas y los marcadores que se discutieron previamente, la expresión de moléculas de adhesión que se conoce que son importantes para la mediación de la activación de células T y la modulación de la respuesta inmune cambia además dramáticamente pero de manera reproducible en el transcurso del proceso de expansión *ex vivo*. Por ejemplo, CD62L es importante para el alojamiento de las células T en los tejidos linfoides y el tráfico de células T a los sitios de inflamación. Bajo ciertas circunstancias de enfermedad y lesión, la presencia de células T activadas en estos sitios puede ser desventajosa. Debido a que la regulación negativa de CD62L se produce tempranamente después de la activación, las células T podrían expandirse durante períodos de tiempo más cortos. Por el contrario, los períodos más largos de tiempo en cultivo podrían generar una población de células T con niveles más altos de CD62L y así una capacidad mayor para dirigir a las células T activadas a estos sitios bajo otras condiciones preferidas. Otro ejemplo de un polipéptido cuya expresión varía en el tiempo es CD49d, una molécula de adhesión que está implicada en el tráfico de los linfocitos de la sangre a los espacios tisulares en sitios de inflamación. La unión del ligando de CD49d a CD49d permite además a la célula T recibir señales co-estimuladoras para la activación y la proliferación a través de la unión por la VCAM-1 o ligandos de fibronectina. La expresión de la molécula de adhesión CD54, implicada en las interacciones células T-APC y célula T-célula T, así como también el alojamiento en los sitios de inflamación, cambia además en el transcurso de la expansión. En consecuencia, las células T pueden estimularse durante períodos de tiempo seleccionados que coinciden con el perfil del marcador de interés y posteriormente recogerse e infundirse. Así, las poblaciones de células T podrían ajustarse para expresar los marcadores que se cree que proporcionarían mayor beneficio terapéutico para la indicación a tratar.

45 En las diferentes modalidades, el experto en la técnica 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.

55 Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que las metodologías para la estimulación de células descritas en la presente invención pueden llevarse a cabo en una variedad de ambientes (*es decir*, recipientes). Por ejemplo, tales recipientes pueden ser frascos de cultivo, bolsas de cultivo, o cualquier recipiente capaz retener las células, preferentemente en un ambiente estéril. En una modalidad de la presente invención es además útil un biorreactor. Por ejemplo, varios fabricantes hacen actualmente los dispositivos que pueden utilizarse para cultivar células y usarse en combinación con los métodos de la presente invención. Ver por ejemplo, Celdyne Corp., Houston, TX; Unisyn Technologies, Hopkinton, MA; Synthecon, Inc. Houston, TX; Aastrom Biosciences, Inc. Ann Arbor, MI; Wave Biotech LLC, Bedminster, NJ. Además, las patentes que cubren tales biorreactores incluyen las patentes de Estados Unidos núms.: 6,096,532; 5,985,653; 5,888,807; 5,190,878.

65 En una modalidad, el imán usado para la estimulación y la concentración simultáneas de las células de la presente invención puede incorporarse en la plataforma de base oscilante de un dispositivo biorreactor, tal como "The Wave"

- (Wave Biotech LLC, Bedminster, NJ). El imán, o un elemento magnetizable, pueden adjuntarse además en un recipiente biorreactor estándar tal como una unidad de aplicación cilíndrica. Este elemento magnético empotrado puede ser capaz de conectarse y desconectarse como se desee en diversos puntos en el procedimiento de cultivo celular. El imán integrado, o elemento magnetizable, se posiciona con el fin de permitir que un campo magnético que emane de ahí pase a través del recipiente de cultivo. En ciertas modalidades, el imán, o elemento magnetizable, se incorpora dentro de una pared, o alternativamente, dentro del cuerpo del recipiente de cultivo. En una modalidad adicional, las células pueden concentrarse y/o activarse magnéticamente, separarse magnéticamente o aislarse en un punto deseado durante el cultivo sin la necesidad de transferir las células a un cultivo diferente o unidad de separación magnética. El uso de tal elemento magnético empotrado puede facilitar los procesos de cultivo, estimulación y concentración, y separación para permitir la expansión y el ajuste de las poblaciones específicas de células funcionales para la infusión inmunoterapéutica en pacientes en terapias basadas en células o genes. Además, este dispositivo proporciona un medio mejorado para la producción específica de moléculas tanto en el interior de las células como su secreción al exterior de las células.
- El dispositivo magnético o magnetizable integrado como se describió anteriormente puede usarse tanto para eliminar las partículas magnéticas del cultivo, como para retenerlas en el recipiente de cultivo, mientras que se eliminan las células deseadas y/o moléculas deseadas presentes en los medios de cultivo. Alternativamente, las células y/o moléculas deseadas pueden retenerse específicamente en la bolsa de cultivo, u otro recipiente de cultivo adecuado, mediante la interacción con partículas magnéticas que se recubren con moléculas específicas como se describe en la presente invención que se unen a las células y/o moléculas deseadas. El dispositivo magnético o magnetizable incorporado permite el lavado de las poblaciones de células y la sustitución de los medios en la bolsa de cultivo celular mediante la inmovilización/concentración de las células de manera magnética con partículas específicas y medios continuos y/u otras soluciones a través de la bolsa. Este dispositivo elimina de manera efectiva la necesidad de un dispositivo de separación magnética separado por proporcionar un sistema completamente integrado, reduciendo así el tiempo del proceso y las operaciones manuales para los conectores de tubo, lo que reduce el número de recipientes que se utilizan en el procesamiento y reduce la probabilidad de contaminación a través del número de tubos y conexiones del recipiente que se requieren. Este sistema cultivo-dispositivo magnético o magnetizable integrado reduce además los volúmenes necesarios en el procesamiento y la formulación del cultivo.
- Como se mencionó previamente, un aspecto de la presente invención se dirige al sorprendente hallazgo de que la combinación de una fuerza que induce la concentración de las células, la ligación de porciones de la superficie celular, y el cultivo de células en un sistema oscilante, cerrado, resulta en una mejora profunda en la activación y expansión de estas células. En consecuencia, en una modalidad, se usa un biorreactor con una plataforma de base oscilante, por ejemplo tal como "The Wave" (Wave Biotech LLC, Bedminster, NJ), que permite velocidades de oscilación variables y en una variedad de ángulos de oscilación diferentes. El técnico con experiencia reconocerá que cualquier plataforma que permite el movimiento adecuado para la expansión óptima de las células está dentro del contexto de la presente invención. En ciertas modalidades, los métodos de estimulación y expansión de la presente invención proporcionan la oscilación del recipiente de cultivo durante el proceso de cultivo a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 oscilaciones por minuto.
- En ciertas modalidades, la capacidad del recipiente biorreactor está en el intervalo de aproximadamente 0.1 litros a aproximadamente 200 litros de medio. El técnico con experiencia apreciará fácilmente que el volumen que se utiliza para el cultivo variará en dependencia del número de células de partida y del número final de células deseado. En modalidades particulares, las células de la presente invención, tales como las células T se siembran a una concentración inicial de aproximadamente  $0.2 \times 10^6$  células/ml a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml, y cualquier concentración entre las mismas. En una modalidad particular, las células pueden cultivarse inicialmente en un ambiente estático y transferirse a un biorreactor en una plataforma oscilante después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más días de cultivo. En una modalidad relacionada, todo el proceso de estimulación, activación, y expansión tiene lugar en un biorreactor que comprende una plataforma oscilante y un imán integrado, como se describió anteriormente. Los biorreactores ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, "The Wave".
- En una modalidad particular, los métodos de estimulación celular de la presente invención se llevan a cabo en un sistema cerrado, tal como un biorreactor, que permite la perfusión de medio a velocidades variables, tal como de aproximadamente 0.1 ml/minuto a aproximadamente 3 ml/minuto. En consecuencia, en ciertas modalidades, el recipiente de tal sistema cerrado comprende un filtro de salida, un filtro de entrada, y un puerto de muestreo para la transferencia estéril hacia y desde el sistema cerrado. En otras modalidades, el recipiente de tal sistema cerrado comprende una bomba de jeringa y un control para la transferencia estéril hacia y desde el sistema cerrado. Modalidades adicionales proporcionan un mecanismo, tal como una celda de carga, para el control de la entrada y salida de los medios mediante la monitorización continua del peso del recipiente biorreactor. En una modalidad, el sistema comprende un distribuidor de gas. En otra modalidad, el biorreactor de la presente invención comprende un mezclador de gas CO<sub>2</sub> que suministra una mezcla de aire del ambiente y CO<sub>2</sub> al recipiente biorreactor y mantiene el recipiente a presión positiva. En otra modalidad, el biorreactor de la presente invención comprende un elemento térmico variable.
- En una modalidad, se permite la entrada de los medios en el recipiente a partir del día 2, 3, 4, 5, o 6 en aproximadamente 0.5 a 5.0 litros por día hasta que se alcanza el volumen final deseado. En una modalidad

preferida, los medios entran en el recipiente a 2 litros por día a partir del día 4, hasta que el volumen alcanza los 10 litros. Una vez que se alcanza el volumen deseado, puede iniciarse la perfusión de los medios. En ciertas modalidades, la perfusión de los medios a través del sistema se inicia en aproximadamente el día 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 del cultivo. En una modalidad, se inicia la perfusión cuando el volumen es de aproximadamente 0.1 litros a aproximadamente 200 litros de medio. En una modalidad particular, se inicia la perfusión cuando el volumen final está en 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o 20 litros.

En una modalidad adicional de la presente invención, las células, tales como las células T, se cultivan hasta 5 días en un sistema cerrado estático, y después se transfieren a un sistema cerrado que comprende un elemento oscilante para permitir la oscilación del recipiente de cultivo a velocidades variables.

En ciertos aspectos, las metodologías de la presente invención proporcionan la expansión de las células, tales como células T, a una concentración de aproximadamente entre  $6 \times 10^6$  células/ml y aproximadamente  $90 \times 10^6$  células/ml en menos de aproximadamente dos semanas. Particularmente las metodologías en la presente invención proporcionan la expansión de las células T a una concentración de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o  $85 \times 10^6$  células/ml y todas las concentraciones entre ellas. En ciertas modalidades, las células alcanzan una concentración deseada, tal como cualquiera de las enumeradas anteriormente, aproximadamente a los 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 días de cultivo. En una modalidad, las células T se expanden en al menos aproximadamente 1.5 veces en aproximadamente 24 horas desde aproximadamente el día 4 hasta aproximadamente el día 12 de cultivo. En una modalidad, las células, tales como las células T, se expanden desde un número de células de partida de aproximadamente  $100 \times 10^6$  hasta un total de aproximadamente  $500 \times 10^9$  células en menos de aproximadamente dos semanas. En modalidades adicionales, las células T se expanden desde un número de células de partida de aproximadamente  $500 \times 10^6$  hasta un total de aproximadamente  $500 \times 10^9$  células en menos de aproximadamente dos semanas. En modalidades relacionadas, las células se expanden desde un número de partida de alrededor de  $100\text{-}500 \times 10^6$  hasta un total de aproximadamente 200, 300, o  $400 \times 10^9$  células en menos de aproximadamente dos semanas.

En modalidades adicionales de la presente invención, los métodos de activación y expansión celular descritos en la presente invención y el medio condicionado que se genera con el uso de estos métodos pueden utilizarse para la producción de exosomas. En las células, pueden formarse vesículas mediante la gemación de la membrana endosomal hacia el lumen del compartimento, este proceso resulta en la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs). La fusión de MVBs con la membrana plasmática resulta en la secreción de las pequeñas vesículas internas, denominadas exosomas. El medio condicionado puede utilizarse para el cultivo de otras células T o el cultivo de otros tipos celulares.

Aunque los anticuerpos usados en los métodos descritos en la presente invención descripción pueden obtenerse fácilmente a partir de fuentes públicas, tales como la 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 técnica 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 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. Un polisacárido puede incluir, por ejemplo, celulosa, agarosa, dextrano, quitosana, ácido hialurónico, o alginato. Otros polímeros pueden incluir poliésteres, poliéteres, polianhidridos, polialquicianoacrilatos, poli(acrilamida), polioctoésteres, 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 no biodegradables pueden incluir polímeros, tales como poli(dimetilsiloxano) y poli(etileno-acetato de vinilo). Otros polímeros que comprenden una superficie pueden incluir vidrio, sílice, silicio, hidroxiapatito, hidrogeles, colágeno, acroleína, poli(acrilamina), 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 célula. 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  $\mu\text{m}$

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, 2.8  $\mu\text{m}$  y 4.5  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ . Además, cuando se usan perlas paramagnéticas, típicamente las perlas están en un intervalo de tamaño de aproximadamente 2.8  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  y con mayor preferencia de aproximadamente 2.8  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . 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 o acoplado a, o integrado en una superficie por una variedad de métodos conocidos y disponibles en la técnica. 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 puede lograrse mediante 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. Por ejemplo, el anticuerpo a un ligando primero puede unirse a una superficie, o avidina o estreptavidina puede estar unida a la superficie para la unión a un ligando biotinilado. 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 implican 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 singular o de orígenes múltiples y pueden ser anticuerpos o fragmentos de estos. Adicionalmente, aunque la unión covalente del ligando a la superficie es una metodología preferida, puede usarse además 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 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-CD3 y anticuerpos anti-CD28. En modalidades adicionales, las superficies pueden recubrirse con tres o más agentes, tales como combinaciones de cualquiera de los agentes descritos en la presente invención, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD28 y anticuerpos anti-4-1 BB.

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 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<sup>+</sup> 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 1:100. 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 1:30. 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 1:3. En aún otra modalidad, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a las perlas de 3:1.

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

#### Agentes

Los agentes contemplados por la presente invención incluyen ligandos de proteínas, ligandos naturales y ligandos sintéticos. Los agentes que pueden unirse a porciones de superficie celular, y bajo ciertas condiciones, provocar la ligación y la agregación que conducen a la señalización incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos. Los agentes pueden aislarse de fuentes naturales tales como células, productos de la sangre, y tejidos, o aislarse de células propagadas *in vitro*, o preparadas de manera recombinante, o por otros métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

En un aspecto de la presente invención, 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 anticuerpos dirigidos a la proteína de 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 técnica para generar anticuerpos, antisueros 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. 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 "inmuno-específicos" si se unen específicamente al ligando con una constante de afinidad,  $K_a$ , mayor que o igual a aproximadamente  $10^4 \text{ M}^{-1}$ , preferentemente mayor que o igual a aproximadamente  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , con mayor preferencia mayor que o igual a aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , y aún con mayor preferencia mayor que o igual a aproximadamente  $10^7 \text{ M}^{-1}$ . 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. Estados Unidos 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 técnica (*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 antisueros 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.

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 técnica para determinar las secuencias de aminoácidos que más probablemente genere una respuesta antigénica en un animal huésped (*Ver, por ejemplo*, Novotny, Mol. Immuno/. 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 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 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.

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 y Milstein (Nature, 256:495-497, 1975; Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976) y mejoras a ellos. Los hibridomas, que son líneas celulares eucariotas inmortalizadas, 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 como se describió anteriormente. Las células linfoides, más comúnmente, células del bazo, obtenidas de un animal inmunizado pueden inmortalizarse 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 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 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 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 humanas (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 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 técnica 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 técnica, 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')<sub>2</sub>, 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')<sub>2</sub> seguida por la alquilación (*Ver, por ejemplo, Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston*).

5 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 uniendo 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 técnica, 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.

15 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. Immuno/. 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*).

#### Poblaciones celulares

25 Estas metodologías pueden usarse terapéuticamente en una configuración *ex vivo* para activar y estimular las células para la infusión en un paciente o podrían utilizarse *in vivo*, para inducir eventos de señalización celular en una población de células diana. Sin embargo, como se indicó además anteriormente, el ejemplo prototípico que se proporciona en la presente invención se dirige a las células T.

30 Con respecto a las células T, las poblaciones de células T resultantes de las diversas metodologías de expansión descritas en la presente invención pueden tener una variedad de propiedades fenotípicas específicas, en dependencia de las condiciones empleadas. Tales propiedades fenotípicas incluyen la expresión mejorada de CD25, CD154, IFN- $\gamma$  y GM-CSF, así como también la expresión alterada de CD137, CD134, CD62L y CD49d. La capacidad de controlar de manera diferencial la expresión de estas porciones puede ser muy importante. Por ejemplo, los niveles más altos de expresión en la superficie de CD154 en "células T ajustadas", a través del contacto con moléculas CD40 expresadas en células presentadoras de antígeno (tales como células dendríticas, monocitos, y aún células B leucémicas o linfomas), mejorarán la presentación de antígenos y la función inmune. Estas estrategias se usan actualmente por diversas empresas para ligar CD40 a través de anticuerpos o CD40L recombinante. El enfoque descrito en la presente invención permite que esta misma señal se envíe en una forma más fisiológica, *por ejemplo*, mediante la célula T. La capacidad de aumentar la secreción de IFN- $\gamma$  mediante el ajuste del proceso de activación de células T (XCELLERATE) podría ayudar a promover la generación de respuestas inmunes de tipo TH1, importantes para las respuestas anti-tumorales y anti-virales. Al igual que CD154, el aumento de la expresión de GM-CSF puede servir para mejorar la función de las APC, particularmente a través de su efecto sobre la promoción de la maduración de las progenitoras de APC en APC funcionalmente más competentes, tales como células dendríticas. La alteración de la expresión de CD137 y CD134 puede afectar la capacidad de una célula T para resistir o ser susceptible a señales apoptóticas. El control de la expresión de los receptores de adhesión/alojamiento, tales como CD62L y/o CD49d puede determinar la capacidad de las células T infundidas de alojarse en los órganos linfoides, sitios de infección, o sitios tumorales.

50 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una composición o población de células T que se reduce en células CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> antes de la expansión. En una modalidad, las células CD8<sup>+</sup> se reducen mediante anticuerpos dirigidos al marcador de CD8<sup>+</sup>. Un experto en la técnica será capaz de identificar fácilmente una variedad de metodologías particulares para reducir una muestra de células CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> o por el contrario para enriquecer el contenido de células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Con respecto al enriquecimiento de células CD4<sup>+</sup>, un aspecto de la presente invención se centra en la identificación de un perfil de expresión de CD154 extremadamente robusto tras la estimulación de poblaciones de células T en donde se han reducido las células T<sub>C</sub> (CD8<sup>+</sup>). Como se indicó anteriormente, CD154 es una molécula inmunomoduladora importante cuya expresión es extremadamente beneficiosa en la amplificación de la respuesta inmune. En consecuencia es probable que un aumento en la expresión de CD154 conduzca a composiciones de células T más eficaces.

60 Un aspecto adicional de a presente invención proporciona una composición o población de células T 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- $\gamma$ , 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 expansión. En una modalidad, 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 técnica fácilmente será capaz de identificar una variedad de metodologías particulares para reducir o seleccionar positivamente una muestra de células que expresan un marcador deseado.

- 5 Las propiedades fenotípicas de las poblaciones de células T de la presente invención pueden controlarse mediante una variedad de métodos, que incluye métodos de citometría de flujo estándar y métodos ELISA conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.

10 Métodos de uso

- 10 Adicionalmente a los métodos descritos anteriormente, las células estimuladas y/o activadas mediante los métodos descritos en la presente pueden utilizarse en una variedad de contextos. Con respecto al ejemplo prototípico de las células T, las metodologías descritas en la presente invención pueden utilizarse para expandir selectivamente una población de células T CD28<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, o CD45RO<sup>+</sup> para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas, el cáncer, y en la inmunoterapia. Como resultado, puede producirse una población fenotípicamente única de células T, que es policlonal con respecto a la reactividad ante el antígeno, pero esencialmente homogénea con respecto a CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Adicionalmente, el método permite la expansión de la población de células T en números suficientes para reconstituir la población total de células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> de un individuo (la población de linfocitos en un individuo es de aproximadamente 3-5 X 10<sup>11</sup>). La población de células T resultante puede transducirse también genéticamente y usarse en la inmunoterapia o puede usarse en métodos de análisis *in vitro* de agentes infecciosos. Por ejemplo, una población de linfocitos infiltrantes de tumores puede obtenerse a partir de un individuo afectado con cáncer y la proliferación de las células T puede estimularse a números suficientes. La población de células T resultante puede transducirse genéticamente para expresar el factor de necrosis tumoral (TNF) u otras proteínas (por ejemplo, cualquier número de citocinas, inhibidores de la apoptosis (*por ejemplo*, Bcl-2), genes que protegen a las células de la infección por el VIH tales como RevM10 o intracinas, y similares, moléculas diana, moléculas de alojamiento y/o adhesión y cualquier variedad de anticuerpos o fragmentos de estos (*por ejemplo*, ScFv)) y darse al individuo.

- 30 Un uso particular para las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> de la invención es el tratamiento de la infección por el VIH en un individuo. La infección prolongada con el VIH eventualmente resulta en una marcada disminución en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Esta disminución, a su vez, provoca un estado profundo de inmunodeficiencia, lo que vuelve al paciente susceptible a un conjunto de infecciones oportunistas que amenazan la vida. Puede esperarse que la reposición del número de células T CD4<sup>+</sup> a niveles normales restaure la función inmune en un grado significativo. Así, el método descrito en la presente proporciona un medio para expandir selectivamente células T CD4<sup>+</sup> a números suficientes para reconstituir esta población en un paciente infectado por el VIH. Además puede ser necesario evitar la infección de las células T durante la estimulación a largo plazo o puede desearse que las células T se vuelvan resistentes de manera permanente a la infección por el VIH. Hay un número de técnicas mediante las que las células T pueden volverse resistentes a la infección por el VIH o incapaces de producir el virus antes de restituir las células T al individuo infectado. Por ejemplo, uno o más agentes anti-retrovirales pueden cultivarse con células T CD4<sup>+</sup> antes de la expansión para inhibir la replicación o producción viral del VIH (*por ejemplo*, los fármacos que están dirigidos a la transcriptasa inversa y/u otros componentes de la maquinaria viral, ver *por ejemplo*, Chow y otros Nature 361:650-653, 1993).

- 45 Pueden usarse varios métodos para transducir genéticamente las células T para producir moléculas que inhiban la infección o la replicación del VIH. Por ejemplo, en diversas modalidades, las células T pueden transducirse genéticamente para producir inhibidores transdominantes, "señuelos moleculares", moléculas antisentido, intracinas, o toxinas. Tales metodologías se describen en más detalle en las solicitudes de patente de Estados Unidos núms. 08/253,751, 08/253,964, y la publicación PCT núm. WO 95/33823.

- 50 Los métodos para estimular y expandir una población de células T antígeno específicas son útiles en situaciones terapéuticas donde se desea regular positivamente una respuesta inmune (*por ejemplo*, inducir una respuesta o mejorar una respuesta existente) tras la administración de células T a un sujeto. Por ejemplo, el método puede usarse para mejorar una respuesta de células T contra antígenos asociados a tumores. Típicamente las células tumorales de un sujeto expresan antígenos asociados a tumores pero pueden ser incapaces de estimular una señal co-estimuladora en las células T (*por ejemplo*, debido a que carecen de la expresión de moléculas co-estimuladoras). Así, las células tumorales pueden ponerse en contacto *in vitro* con las células T del sujeto y las células T antígeno específicas se expanden de acuerdo con el método de la invención y las células T son retornadas al sujeto.

- 60 En consecuencia, en una modalidad pueden tratarse cánceres como el linfoma no Hodgkin (NHL) y la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL). Si bien los estudios iniciales usando células T expandidas se han estudiado en el NHL, (ver Liebowitz y otros, Curr. Opin. Onc. 10:533-541, 1998), las poblaciones de células T de la presente invención ofrecen características fenotípicas únicas que pueden mejorar dramáticamente el éxito de la inmunoterapia al proporcionar un injerto (suministrado probablemente mediante la estimulación de la señal de CD28) y una reactividad aumentados. Sin embargo, los pacientes con B-CLL presentan dificultades especiales, que incluyen números relativamente bajos de células T con una carga alta de células leucémicas en sangre periférica,

acompañado de una inmunosupresión general de células T. Las poblaciones de células T de la presente invención pueden proporcionar una eficacia dramáticamente mejorada para el tratamiento de esta enfermedad y especialmente cuando se combina con la terapia de trasplante de células madre. En consecuencia, sería beneficioso aumentar la función de las células T y la actividad anti- CLL de las células T con perlas co-inmovilizadas con anti-CD3 x anti-CD28.

Por ejemplo, dado que la expresión deficiente de CD154, el ligando para CD40, en las células T de pacientes con B-CLL se ha citado como un importante defecto inmunológico de la enfermedad, las poblaciones de células T de la presente invención, que pueden proporcionar niveles altos y sostenidos de expresión de CD154 después de la re-infusión, podrían ayudar en su tratamiento. Los investigadores informan que en la CLL las células T de un paciente tienen una capacidad defectuosa para expresar CD154 así como también la capacidad de las células B leucémicas para expresar CD80 y CD86. El fracaso de las células B leucémicas en la CLL para expresar adecuadamente los ligandos para CD28, puede resultar en un fracaso para activar completamente las células T respondedoras al tumor y, por lo tanto, puede representar el mecanismo subyacente del aparente estado de tolerancia de las células T. Los estudios donde el CD40 está ocupado sobre las células B de CLL, a través de anticuerpos anti-CD40 solubles o a través de células B leucémicas transducidas a CD154, parecen corregir el defecto en la expresión de CD80 y CD86 y regular positivamente la expresión del MHC en la superficie. Kato y otros, J. Clin. Invest. 101:1133-1141, 1998; Ranheim y Kipps, J. Exp. Med 177:925-935, 1993. Las células tratadas de esta manera fueron capaces de estimular respuestas antitumorales de células T específicas.

Con la expresión mejorada del CD154 sobre la superficie de la población de células T de la presente invención se esperaría que tales células T interactuaran con las células autólogas de la B-CLL, y así aumentaría la inmunogenicidad del tumor al impulsar la expresión de MHC, CD80, y CD86. Esto, a su vez, debe conducir a una fuerte respuesta antitumoral. Más aún, el experto en la técnica entenderá fácilmente que el tratamiento de un paciente con las células T expandidas *ex vivo* de la presente invención puede combinarse con las terapias tradicionales contra el cáncer, tales como la quimioterapia. En este sentido, por ejemplo, un paciente puede tratarse con un agente tal como la Fludarabina o Campath (Berlex Laboratories, Montville, NJ, Estados Unidos), seguido de una infusión con poblaciones de células T de la presente invención o ambos.

Alternativamente, las células T pueden estimularse y expandirse como se describe en la presente para inducir o mejorar la sensibilidad a agentes patógenos, tales como los virus (*por ejemplo*, el virus de inmunodeficiencia humana), bacterias, parásitos y hongos.

La invención proporciona además métodos para expandir selectivamente una subpoblación específica de células T a partir de una población mixta de células T. Particularmente, la invención proporciona poblaciones de células T enriquecidas específicamente que tienen una relación mucho más alta de células T dobles positivas CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Otra modalidad de la invención, proporciona un método para expandir selectivamente una población de células T<sub>H1</sub> a partir de una población de células CD4<sup>+</sup>. En este método, las células T CD4<sup>+</sup> se co-estimulan con un anticuerpo anti-CD28, tal como el anticuerpo monoclonal 9.3, que induce la secreción de citocinas específicas T<sub>H1</sub>, que incluyen, el IFN- $\gamma$ , lo que resulta en el enriquecimiento de células T<sub>H1</sub> sobre células T<sub>H2</sub>.

La observación en la presente invención de que los rasgos fenotípicos de las células T activadas varían con el tiempo durante el proceso de expansión, combinó con el hecho de que se ha demostrado que las células T se activan en unas pocas horas (Lezzi y otros, Immunity 8:89-95, 1998). En consecuencia, en combinación con las metodologías descritas en la presente, esto proporciona la capacidad de expandir un subconjunto hecho a la medida de una población de células T en un corto período de tiempo. En una modalidad, esta técnica puede utilizarse en la cabecera de un sujeto, en una modalidad de paciente ambulatorio, o en la casa de un sujeto, similar al uso de la diálisis renal. Por ejemplo, un método o dispositivo en donde las células T se incuban en contacto con las señales de activación (*por ejemplo*, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y similares) y se devuelven al paciente inmediatamente en un flujo continuo o después de un período de expansión de pocas horas. En un aspecto, tales técnicas de expansión pueden utilizar cámaras aisladas con componentes de filtrado, de tal manera que las perlas 3x28, o micropartículas recubiertas se mezclan similarmente con un flujo continuo de sangre/ células concentradas. En otra modalidad, las superficies sólidas dentro de un aparato pueden recubrirse o conjugarse directamente (que incluye covalentemente) o indirectamente (*por ejemplo*, estreptavidina/biotina y similares) con anticuerpos u otros componentes para estimular la activación y expansión de las células T. Por ejemplo, puede utilizarse un trayecto continuo de fluido a partir del paciente a través de un dispositivo de extracción de sangre/célula y/o un dispositivo desechable que contiene dos o más anticuerpos inmovilizados (*por ejemplo*, anti-CD3 y anti-CD28) u otros componentes para estimular los receptores requeridos para la activación de las células T antes que las células regresen al sujeto (inmovilizados sobre superficies de plástico o sobre micropartículas separables). Dicho sistema puede implicar un instrumento de leucocitaféresis con un conjunto desechable estéril acoplado al conjunto desechable existente del fabricante, o ser una adaptación al conjunto desechable del fabricante (*por ejemplo*, la plataforma superficial sobre la que están inmovilizados/contenidos los anticuerpos/componentes de la activación está dentro de la bolsa/recipiente para la extracción de las células mononucleares de sangre periférica durante la aféresis). Más aún, la superficie sólida/plataforma superficial puede ser una parte de un inserto de extracción que se inserta en una de las cámaras del dispositivo o está presente físicamente dentro de uno de los componentes

desechables. En otra modalidad del aspecto de flujo continuo discutido anteriormente, el sistema puede comprender poner en contacto a las células con los componentes de activación a temperatura ambiente o a temperatura fisiológica usando una cámara dentro de un dispositivo de extracción de sangre o una cámara de incubación establecida en serie con el trayecto del flujo al paciente.

5 En otro ejemplo, la sangre se extrae directamente del paciente en un dispositivo desechable autónomo que contiene dos o más anticuerpos inmovilizados (*por ejemplo*, anti-CD3 y anti-CD28) u otros componentes para estimular los receptores requeridos 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); éstas 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.

20 Dado que los dispositivos y métodos para extraer y procesar sangre y productos sanguíneos son bien conocidos, un experto en la técnica 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 ellos) pueden inmovilizarse o separarse de la sangre o producto sanguíneo antes de la administración al sujeto. Además, como los expertos en la técnica 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 crioconservada, de células mononucleares de sangre periférica, de otras células derivadas de sangre crioconservada o líneas de células T crioconservadas 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.

## EJEMPLOS

### 40 EJEMPLO I

#### ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS T

45 En algunos experimentos descritos en la presente, se utilizó el proceso referido como XCELLERATE™. Brevemente, en este proceso, las células T XCELLERATED™ se producen a partir de un producto de aféresis de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Después de la extracción a partir del paciente en el sitio clínico, las PBMC de la aféresis se lavan y después se incuban con DYNABEADS® M-450 Epoxy T "no recubiertas". Durante este tiempo las células fagocíticas tales como los monocitos ingieren las perlas. Después de la incubación, las células y las perlas se procesan a través de un Separador Magnético MaxSep con el fin de eliminar las perlas y cualquier célula monocítica/fagocítica unida a las perlas. Luego de esta etapa de reducción de monocitos, se toma un volumen que contiene un total de  $5 \times 10^8$  de células T CD3<sup>+</sup> y se unen con  $1.5 \times 10^9$  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 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T se incuba después a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> 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 expansión o expansión adicional 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  $5 \times 10^8$  células T CD3<sup>+</sup> y se unen con  $1.5 \times 10^9$  DYNABEADS® CD3/CD28 T 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 CO<sub>2</sub>, las células T CD3<sup>+</sup> 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.

65 Con un proceso modificado referido como XCELLERATE II™ el proceso descrito anteriormente se utilizó con algunas modificaciones donde no se utilizó ninguna etapa de reducción de monocitos por separado y en ciertos procesos las células se congelaron antes del contacto inicial con las perlas y se realizó una concentración y

estimulación adicional. (Ver Figuras 5A y 5B). En una versión de este proceso las células T se obtuvieron a partir de la sangre circulante de un donante o paciente mediante aféresis. Los componentes de un producto de aféresis típicamente incluyen linfocitos, monocitos, granulocitos, células B, otras células nucleadas (células blancas de la sangre), células rojas de la sangre y plaquetas. Un producto típico de aféresis contiene 1 - 2 x10<sup>10</sup> células nucleadas. Las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato libre de calcio y magnesio para eliminar las proteínas del plasma y las plaquetas. La etapa de lavado se realizó mediante la centrifugación de las células y la eliminación del líquido sobrenadante, que después se sustituye por PBS. El proceso se logró usando una centrífuga semi-automática de "flujo continuo" (Sistema COBE 2991, Baxter). Las células se mantienen en un sistema cerrado mientras se procesan.

Las células pueden procesarse además mediante reducción de las células no unidas, que incluyen monocitos, (enriquecidos por las células activadas) y después se continúa con la estimulación. Alternativamente, las células lavadas pueden congelarse, almacenarse, y procesarse más tarde, lo que se demuestra en la presente para aumentar la robustez de la proliferación así como también la reducción de los granulocitos. En un ejemplo, para congelar las células, una suspensión de 35 ml de células se coloca en una bolsa de congelación Cryocyte de 250 ml junto con 35 ml de la solución de congelación. La suspensión celular de 35 ml contiene típicamente 3.5x10<sup>9</sup> a 5.0x10<sup>9</sup> células en PBS. Se añade un volumen igual de la solución de congelación (DMSO 20% y albúmina sérica humana 8% en PBS). Las células están a una concentración final de 50x10<sup>6</sup> células/ml. La bolsa Cryocyte puede contener volúmenes en el intervalo de 30 - 70 ml, y la concentración de células puede estar en el intervalo de 10 a 200x10<sup>6</sup> células/ml. Una vez que la bolsa Cryocyte se llena de células y la solución de congelación, la bolsa se coloca en un congelador de velocidad controlada y las células se congelan a 1°C/minuto hasta -80°C. Las células congeladas se colocan después en un sistema de almacenamiento de nitrógeno líquido hasta que se necesiten.

Las células se extraen del sistema de almacenamiento de nitrógeno líquido y se descongelan a 37°C. Para eliminar el DMSO, las células descongeladas se lavan después con PBS libre de calcio y de magnesio en el Sistema COBE 2991. Las células lavadas se pasan después a través de un filtro de malla de 80 micras.

Las células descongeladas, aproximadamente 0.5x10<sup>9</sup> células CD3<sup>+</sup>, se colocan en una bolsa plástica Lifecell de 1L que contiene 100 ml de PBS libre de calcio y de magnesio. El PBS contiene 1% - 5% de suero humano. Además se colocan 1.5x10<sup>9</sup> perlas 3x28 (DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T) en la bolsa con las células (3:1 de DYNABEADS M-450 CD3/CD28 T: células T CD3<sup>+</sup>). Las perlas y las células se mezclan a temperatura ambiente a ~ 1 RPM (rotación de extremo a extremo) durante aproximadamente 30 minutos. La bolsa que contiene las perlas y las células se coloca en el Separador Magnético MaxSep (Nexell Therapeutics, Irvine, CA). Entre la bolsa y el MaxSep, se coloca un espaciador de plástico (aproximadamente 6 mm de espesor). (Para aumentar la intensidad magnética se elimina el espaciador.) Las perlas y cualquiera de las células unidas a las perlas se retienen en el imán mientras que el PBS y las células no unidas se bombean lejos.

Las perlas 3x28 y las células concentradas unidas a las perlas se lavan con medios de cultivo celular (1 litro que contiene X-Vivo 15, BioWhittaker; con 50 ml de una mezcla de suero humano inactivado con calor, 20 ml de Hepes 1 M, 10 ml de L-glutamina 200 mM con o sin aproximadamente 100,000 I.U. de IL-2) en una bolsa de cultivo Lifecell de 3L. Después de transferir las perlas 3x28 y las células seleccionadas positivamente en la bolsa Lifecell, se añade medio de cultivo hasta que la bolsa contenga 1000 ml. La bolsa que contiene las células se coloca en una incubadora (37°C y 5% de CO<sub>2</sub>) y a las células se les permite expandirse.

Las células se dividieron 1 a 4 en cada uno de los días 3 y 5. La activación y proliferación de las células T se midió al cosechar las células después de 3 días y 8 días en cultivo. La activación de las células T se evaluó mediante la medición del tamaño celular, el nivel de expresión de marcadores de superficie celular, particularmente la expresión de CD25 y CD154 el día 3 del cultivo. El día 8 las células se dejaron fluir por gravedad (aprox. 150 ml/min) sobre el imán MaxSep para eliminar las partículas magnéticas y las células se lavan y se concentran utilizando el dispositivo COBE indicado anteriormente y se resuspenden en una solución electrolítica equilibrada adecuada para la administración intravenosa, tal como Plasma-Lyte A® (Baxter-Healthcare).

Como se describe dentro de la especificación XCELLERATE I™ refiere condiciones similares a lo anterior, excepto que no se realizó la estimulación y la concentración y la reducción de monocitos se realizó antes de la estimulación.

Se realizaron tanto los procesos XCELLERATE I™ como II™ y la proliferación de las células T se midió después de 8 días en cultivo. El rendimiento de las células T expandidas fue mayor cuando las células CD3<sup>+</sup> se concentraron antes del cultivo celular. (Ver Tabla 1). Adicionalmente, la población celular tuvo más de un 90% de células CD3<sup>+</sup>.

Tabla 1 Rendimiento de la expansión de las células T el día 8

Experimento	Sin Concentración de CD3 <sup>+</sup> (XCELLERATE I)	Concentración de CD3 <sup>+</sup> (XCELLERATE II)
NDa079	33 × 10 <sup>9</sup>	36 × 10 <sup>9</sup>
NDa081	38 × 10 <sup>9</sup>	42 × 10 <sup>9</sup>
NDa082	28 × 10 <sup>9</sup>	38 × 10 <sup>9</sup>
Promedio	33 ± 5 × 10 <sup>9</sup>	39 ± 3 × 10 <sup>9</sup>

En este sentido se realizaron experimentos adicionales que describen el número total de células expandidas así como también el incremento de la expansión de nueve lotes de células estimuladas sin concentración de las CD3<sup>+</sup> y cinco lotes de células estimuladas con concentración de las CD3<sup>+</sup>. (Ver Figuras 1 y 2).

5 La concentración de las células mediante la aplicación de una fuerza magnética antes del cultivo aumenta de manera efectiva la pureza de las células CD3<sup>+</sup>, así como también incrementa los niveles de CD154. (Tabla 2, las Figuras 3 y 4 describen gráficamente los niveles de CD154). Además, la comparación de la proliferación de las células T donde las poblaciones de células T se expusieron a imanes de diferentes intensidades mostró que la 10 exposición a un imán más fuerte resultó en un mayor rendimiento de células CD3<sup>+</sup>. (Tabla 2.)

Tabla 2 Comparación de la proliferación de células T y de los marcadores de superficie celular después de la concentración con el uso de imanes débiles y fuertes

Experimento	Imán	Día	CD3%	Tamaño (FSC)	CD25 (MFI)	CD154 (MFI)	CD3# x 10 <sup>9</sup>
NDa087							
Preselección		0	47%	318	8	4	0.5
Selección posterior	Débil	0	56%				0.37
Selección posterior	Fuerte	0	61%				0.35
Ninguna selección	Ninguno	3		533	758	19	
Selección posterior	Débil	3	90%	570	846	41	
Selección posterior	Fuerte	3	92%	558	1006	45	
Cultivo posterior	Ninguno						
Cultivo posterior	Débil	8	92%	412	110	9	17.7
	Fuerte	8	93%	413	89	7	37.8
NDa089							
Preselección		0	44%	312	6	4	0.5
Selección posterior	Débil	0	46%				0.39
Selección posterior	Fuerte	0	55%				0.3
Selección							
Selección posterior	Débil	3	83%	589	685	67	
Selección posterior	Fuerte	3	83%	600	720	115	
Cultivo posterior	Débil	8	89%	409	58	18	25.3
	Fuerte	8	87%	371	65	13	42.1
Experimento	Imán		CD25 el día 0 (MFI)	CD25 el día 3 (MFI)	CD154 el día 0 (MFI)	CD154 el día 3 (MFI)	# células CD3 el día 8 x 10 <sup>9</sup>
NDao87							
Sin selección	Ninguno		8	758	4	19	31
Selección	Débil		8	846	4	41	18

Selección	Fuerte	8	1006	4	45	38
NDao87						
Sin selección	Ninguno	6	309	4	12	26
Selección	Débil	6	685	4	67	25
Selección	Fuerte	6	720	4	115	42

5 Se realizaron cinco experimentos adicionales para comparar el proceso de XCELLERATE I™ con el XCELLERATE II™. Para las células activadas y expandidas en cultivo de acuerdo con los dos procesos, en la Tabla 3 y en las Figuras 6-7 más abajo se muestran los marcadores de la activación celular (tamaño celular, expresión de CD25, y expresión de CD154) en los días 3 y 8 del cultivo.

Tabla 3: Marcadores de la activación celular el día 3

Número del experimento (donante)	Proceso	Tamaño de las células (FSC)		CD25 (MFI)		CD154 (MFI)	
		Día 0	Día 3	Día 0	Día 3	Día 0	Día 3
NDa104 (PC071)	XCELLERATE I	282	526	7	625	5	50
	XCELLERATE II	315	531	7	750	5	162
NDa107 (PC074)	XCELLERATE I	243	578	5	287	4	23
	XCELLERATE II	272	587	6	311	5	120
NDa110 (PC076)	XCELLERATE I	262	588	6	497	4	59
	XCELLERATE II	284	615	6	580	5	197
NDa113 (PC060)	XCELLERATE I	271	662	5	726	4	54
	XCELLERATE II	291	660	6	741	5	177
NDa115 (PC073)	XCELLERATE I	253	560	6	202	6	25
	XCELLERATE II	252	582	6	448	6	83
<b>Promedio ± Desv. Est</b>	<b>XCELLERATE I</b>	<b>262 ± 15</b>	<b>583 ± 50</b>	<b>6 ± 1</b>	<b>467 ± 221</b>	<b>5 ± 1</b>	<b>42 ± 17</b>
	<b>XCELLERATE II</b>	<b>283 ± 23</b>	<b>595 ± 47</b>	<b>6 ± 1</b>	<b>566 ± 189</b>	<b>5 ± 1</b>	<b>148 ± 17</b>

Todos los cultivos en la Tabla 3 se iniciaron con células que se congelaron/descongelaron.

10 Los datos en la Tabla 3 y las Figuras 6-7 muestran que el proceso XCELLERATE II generó células cuyo tamaño celular y marcadores de activación de la expresión de CD25 en el día 3 fueron similares en promedio, pero típicamente más altos y continuaron siendo mayores después de la estimulación. Sin embargo, el marcador de activación CD154 de las células T en el día 3 del proceso XCELLERATE II™ fue mucho mayor que en las células T del proceso XCELLERATE I™. Además, como se ha demostrado anteriormente, el proceso XCELLERATE II™ generó niveles de CD25 y CD154 que fueron consistentemente más altos por donante que otros métodos.

15 La expresión de CD154 en el día 3 del proceso XCELLERATE II™ es en realidad mucho mayor que para XCELLERATE I™. Esta observación sugiere que las células T están en un estado superior de activación durante el proceso XCELLERATE II™ que en el proceso XCELLERATE I™. Se prevé que esto puede traducirse en un producto más eficaz cuando se administra *in vivo*.

20 Se determinó además la pureza de las células CD3<sup>+</sup>, la relación de células CD4/células CD8, y la viabilidad celular el día 3 del cultivo para cinco muestras de pacientes. El fenotipo y la viabilidad de las células utilizadas sometidas al proceso XCELLERATE I™ y al proceso XCELLERATE II™ se muestran más abajo en la Tabla 4 medidos por citometría de flujo o tinción con azul tripán.

Tabla 4

# NDa	Pureza de células CD3 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup> el día 0	Viabilidad celular el día 0 (%)	Relación CD4:CD8 <sup>ψ</sup> el día 0	Pureza de células CD3 <sup>+</sup> (%) el día 3	Viabilidad celular (%) el día 3	Relación CD4:CD8 el día 3
103 XCELLERATE I	70	92	1.91	79	82	1.3
103 XCELLERATE II	85	99	2.3	91	95	2.4
104 XCELLERATE I	67	95	3.2	84	78	2.7
104 XCELLERATE II	110	99	3.7	93	87	2.9
107 XCELLERATE I	69	99	2.3	85	82	2.3
107 XCELLERATE II	119	99	2.7	95	92	2.8
110 XCELLERATE I	63	99	2.9	91	82	2.6
110 XCELLERATE II	83	99	3.9	93	92	4.5
115 XCELLERATE I	60	99	1.9	92	91	2.7
115 XCELLERATE II	72	99	2.2	96	94	2.8

\* = Pureza de células T CD3<sup>+</sup> el día 0 después de la reducción de monocitos en el proceso XCELLERATE I o tras la concentración magnética en el proceso XCELLERATE II  
 ψ = relación de células T CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> el día 0 tras la reducción de monocitos en el proceso XCELLERATE I o después de la concentración magnética en el proceso XCELLERATE II

EJEMPLO II

5 EFICIENCIA DEL ENRIQUECIMIENTO DE CÉLULAS CD3<sup>+</sup>, REDUCCIÓN DE MONOCITOS Y REDUCCIÓN DE GRANULOCITOS

Para este estudio, después de recibir en el laboratorio Desarrollo de Terapias Xcyte, el producto de aféresis de PBMC entrante se lavó, se dividió y:

10 1. Para el proceso XCELLERATE I, se llevó a cabo una etapa de reducción de monocitos y las PBMC con reducción de monocitos CD14<sup>+</sup> se crioconservaron y se almacenaron en fase de vapor de un congelador LN<sub>2</sub> (como se señaló en el Ejemplo I). El día de la puesta en marcha del proceso XCELLERATE I, las PBMC con reducción de monocitos CD14<sup>+</sup> se descongelaron y el proceso XCELLERATE inició con DYNABEADS M-450 CD3/CD28 T como se detalló en el Ejemplo I. La composición celular promedio y la eficiencia promedio del enriquecimiento de células T CD3<sup>+</sup>, la reducción de monocitos CD14<sup>+</sup> y la reducción de granulocitos en los donantes N = 5 en estas etapas iniciales se muestran en la Tabla 5.1 y los datos de cada donante individual se muestran en la Tabla 5.2.

15 2. Para el proceso XCELLERATE II, las células del producto de aféresis de PBMC se crioconservaron y se almacenaron en fase de vapor de un congelador LN<sub>2</sub>. El día de la puesta en marcha del proceso XCELLERATE II, las células del producto de aféresis de PBMC crioconservadas se descongelaron y las células T CD3<sup>+</sup> se concentraron magnéticamente y el proceso XCELLERATE II inició con DYNABEADS M-450 CD3/CD28 T como se detalló en el ejemplo I. La composición celular promedio y la eficiencia promedio del enriquecimiento de células T CD3<sup>+</sup>, la reducción de monocitos CD14<sup>+</sup> y la reducción de granulocitos de

## ES 2 434 916 T3

los donantes N = 5 en estas etapas iniciales se muestran en la Tabla 5.1 y los datos de cada donante individual se muestran en la Tabla 5.2.

- 5 Como se demuestra en las Tablas 5.1 y 5.2, la combinación de congelación/descongelación del producto de aféresis de PBMC seguido de una concentración magnética de las células T CD3<sup>+</sup> directamente del producto de aféresis de PBMC descongela en la configuración del proceso XCELLERATE II resulta en una eliminación eficiente de monocitos y granulocitos CD14<sup>+</sup> (Tabla 5.1 y Tabla 5.2). La eficiencia de la eliminación de los monocitos y granulocitos CD14<sup>+</sup> en el proceso XCELLERATE II es tan buena como la del proceso XCELLERATE I con el beneficio de que elimina la necesidad de una etapa separada de reducción con el uso del reactivo adicional DYNABEADS M-450 T "no recubiertas" y conduce de manera consistente a una relación CD4/CD8 más alta.

15 Tabla 5.1: Eficiencia promedio (N = 5) del enriquecimiento de células T CD3<sup>+</sup>, con reducción de monocitos y reducción de granulocitos CD14<sup>+</sup> en las etapas iniciales de las configuraciones del proceso XCELLERATE I y del proceso XCELLERATE II

Preparación de células	Promedio ± Desv. Est. Composición celular Dev (%)			
	CD3 <sup>+</sup>	CD14 <sup>+</sup>	Granulocitos	CD4/CD8*
Producto de aféresis de PBMC entrante	49 ± 6	16 ± 3	8 ± 7	2.2 ± 0.3
<b>XCELLERATE I</b>				
PBMC con reducción de monocitos	51 ± 6	5.5 ± 3	5.7 ± 5	2.4 ± 0.6
PBMC con reducción de monocitos congeladas/descongeladas	64 ± 4	6 ± 3	0.4 ± 0.5	2.4 ± 0.6
<b>XCELLERATE II</b>				
Producto de aféresis de PBMC congeladas-descongeladas	56 ± 5	11 ± 2	0.4 ± 0.5	2.4 ± 0.8
Después de la concentración magnética de CD3 <sup>+</sup>	92 ± 22	2.4 ± 3.7	0 ± 0	2.86 ± 0.86
Las composiciones celulares se determinaron mediante citometría de flujo de acuerdo con protocolos estándar.				

20 Tabla 5.2: Comparación de la eficiencia del enriquecimiento de células T CD3<sup>+</sup> con reducción de monocitos y reducción de granulocitos CD14<sup>+</sup> en las etapas iniciales de las configuraciones del proceso XCELLERATE I y del XCELLERATE II

Número del experimento (donante)	Preparación de células	Composición celular (%)			
		CD3 <sup>+</sup>	CD14 <sup>+</sup>	Granulocitos	CD4/CD8*
NDa104 (PC071)	Producto de aféresis de PBMC entrante	43%	11%	14%	2.2
	<b>XCELLERATE I</b>				
	PBMC con reducción de monocitos	54%	5%	12.5%	3.2
	PBMC con reducción de monocitos	67%	4%	0%	3.2
	<b>XCELLERATE II</b>				
	PBMC de aféresis congeladas-descongeladas	64%	7%	0%	3.1
	Después de la concentración magnética de CD3	110%	1%	0%	3.7
NDa107 (PC074)	Producto de aféresis de PBMC entrante	51%	16%	1%	2.1

ES 2 434 916 T3

Número del experimento (donante)	Preparación de células	Composición celular (%)			
		CD3 <sup>+</sup>	CD14 <sup>+</sup>	Granulocitos	CD4/CD8*
	XCELLERATE I				
	PBMC con reducción de monocitos	64%	5%	1%	2.3
	PBMC con reducción de monocitos congeladas/descongeladas	69%	3%	0%	2.3
	XCELLERATE II				
	Producto de aféresis de PBMC congeladas-descongeladas	55%	11%	0%	2.0
	Después de la concentración magnética de CD3 <sup>+</sup>	120%	0%	0%	2.7
NDa110 (PC076)	Entrante	44%	18%	15%	2.5
	XCELLERATE I				
	PBMC con reducción de monocitos	63%	3.5%	10%	2.9
	PBMC con reducción de monocitos congeladas/descongeladas	63%	7%	0%	2.9
	XCELLERATE II				
	Producto de aféresis de PBMC congeladas-descongeladas	55%	13%	0%	3.2
	Después de la concentración magnética de CD3 <sup>+</sup>	83%	1%	0%	3.8
NDa113 (PC060)	Producto de aféresis de PBMC entrante	47%	17%	6%	2.3
	XCELLERATE I				
	PBMC con reducción de monocitos	61%	4%	3%	1.8
	PBMC con reducción de monocitos congeladas/descongeladas	63%	4%	1%	1.8
	XCELLERATE II				
	Producto de aféresis de PBMC congeladas-descongeladas	51%	13%	1%	1.5
	Después de la concentración magnética de CD3 <sup>+</sup>	76%	1%	0%	1.9
NDa115 (PC073)	Producto de aféresis de PBMC Entrante	59%	17%	2%	1.7
	XCELLERATE I				
	PBMC con reducción de monocitos	60%	10%	2%	1.8
	PBMC con reducción de monocitos congeladas/descongeladas	60%	11%	1%	1.9

Número del experimento (donante)	Preparación de células	Composición celular (%)			
		CD3 <sup>+</sup>	CD14 <sup>+</sup>	Granulocitos	CD4/CD8*
	XCELLERATE II				
	Producto de aféresis de PBMC congeladas-descongeladas	53%	12%	1%	2.0
	Después de la concentración magnética de CD3 <sup>+</sup>	72%	9%	0%	2.2

Las composiciones celulares se determinaron mediante citometría de flujo de acuerdo con protocolos estándar.

Adicionalmente a la simplificación y racionalización del proceso por la eliminación de la etapa de reducción de monocitos CD14<sup>+</sup> y los reactivos asociados, la etapa de concentración magnética en el proceso XCELLERATE II™ proporciona además una mayor pureza de las células T CD3<sup>+</sup> y una relación más alta de células T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>: CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> en el inicio de la activación de las células T (Tabla 5.1 y Tabla 5.2).

- 5 Se comparó además el rendimiento, la pureza, la viabilidad y la composición de las células T CD3<sup>+</sup> activadas antes de la cosecha el día 8 del proceso XCELLERATE I™ y del proceso XCELLERATE II™.
- 10 Como se muestra en la Tabla 5.3, el rendimiento promedio, la pureza y la viabilidad de las células T CD3<sup>+</sup> antes de la cosecha el día 8 mejoran típicamente para el proceso XCELLERATE II™ en comparación con XCELLERATE I™.

Tabla 5.3: Rendimiento, pureza, viabilidad y composición de las células T CD3<sup>+</sup> activadas antes de la cosecha el día 8 del proceso XCELLERATE I y el proceso XCELLERATE II

Número del experimento (donante)	Configuración del proceso XCELLERATE	Propiedades del producto de células T CD3 <sup>+</sup> antes de la cosecha			
		# de células T CD3 <sup>+</sup>	Pureza de células T CD3 <sup>+</sup> (%)	Viabilidad (%)	Relación CD4/CD8*
NDa104 (PC071)	XCELLERATE I	65 × 10 <sup>9</sup>	95	97	1.2
	XCELLERATE II	50 × 10 <sup>9</sup>	97	97	1.7
NDa107 (PC074)	XCELLERATE I	57 × 10 <sup>9</sup>	98	98	0.8
	XCELLERATE II	52 × 10 <sup>9</sup>	98	98	1.5
NDa110 (PC076)	XCELLERATE I	41 × 10 <sup>9</sup>	96	96	1.6
	XCELLERATE II	41 × 10 <sup>9</sup>	99	99	2.4
NDa113 (PC060)	XCELLERATE I	41 × 10 <sup>9</sup>	96	96	1.3
	XCELLERATE II	43 × 10 <sup>9</sup>	98	98	2.0
NDa115 (PC073)	XCELLERATE I	31 × 10 <sup>9</sup>	96	96	1.3
	XCELLERATE II	48 × 10 <sup>9</sup>	97	97	1.4
Promedio ± Desv. Est	XCELLERATE I	47 ± 14	96 ± 2	97 ± 1	1.2 ± 0.3
	XCELLERATE II	45 ± 6	98 ± 1	98 ± 1	1.8 ± 0.4

\* = Relación de células T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>: CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>

15 Además, como se muestra en la Tabla 5.3, el proceso XCELLERATE II™ mantiene una relación más alta de células T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>: CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> durante todo el proceso. Esto puede deberse a la concentración preferencial de células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> durante la etapa de concentración magnética (Tablas 5.1 y 5.2).

20 "Entrante" se refiere a las células frescas, lavadas de la aféresis entrante. Las células de partida enumeradas en la Tabla 5.2 para el proceso XCELLERATE I™ fueron células de una aféresis que se lavaron, se agotaron de monocitos y/o se congelaron/descongelaron. Las células de partida enumeradas en la Tabla 5.2 para el proceso XCELLERATE II™ fueron células de aféresis que se lavaron y se congelaron/descongelaron.

\* = Relación de células T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>: CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>

La Tabla 5.3 muestra que el proceso XCELLERATE II™ resultó en un producto celular más puro (en términos de % de células CD3<sup>+</sup>) que el producto celular del proceso XCELLERATE I™. Es decir, las células producto del proceso XCELLERATE II™ tuvieron una pureza de células CD3<sup>+</sup> promedio (± desv. est) de 96% ± 1%, mientras que las células del proceso XCELLERATE I™ tuvieron una pureza promedio de 93% ± 2%.

Además, como se muestra en la Tabla 5.3, el proceso XCELLERATE II™ mantuvo una relación de células CD4/CD8 más alta. Las células entrantes tuvieron una relación promedio de células CD4/CD8 de 2.2 y las células producto del proceso XCELLERATE II™ tuvieron una relación CD4/CD8 de 1.8, mientras que las células producto del proceso XCELLERATE I™ tuvieron una relación CD4/CD8 de 1.2.

Los datos de la Tabla 5.3 muestran además que el proceso XCELLERATE II™ resultó en células producto con una viabilidad promedio de 98%, mientras que el proceso XCELLERATE I™ resultó en células producto con una viabilidad promedio de 97%.

### EJEMPLO III

#### REDUCCIÓN DE MONOCITOS

Los monocitos (células fagocíticas CD14<sup>+</sup>) se eliminan de preparaciones de células T mediante la reducción magnética usando una variedad de perlas Dynal "irrelevantes" (es decir, sin recubrimiento con anticuerpos o sin recubrimiento con anticuerpos diana). La reducción se realizó mediante la incubación previa de sangre total después de la separación en ficoll o sangre periférica de aféresis con perlas Dynal anti-ratón de oveja M-450, o perlas Dynal recubiertas con albúmina sérica humana (M-450), o con perlas Dynal Epoxi (M-450) en más o menos una relación de 2:1 de perlas con relación a células. Las células y las perlas se incubaron durante períodos de 1-2 horas a 22-37 grados C, seguido de la eliminación magnética de las células que se habían unido a las perlas o que habían envuelto a las perlas. Las células restantes se colocaron en cultivo junto con las células no manipuladas. El fenotipo de las células se caracterizó mediante citometría de flujo antes y después de la reducción.

### EJEMPLO IV

#### CONFIGURACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

Se usó un citómetro Becton Dickinson FACSCALIBUR para todos los datos recogidos y presentados. Cualquier citómetro de flujo capaz de realizar un análisis con 3 colores puede usarse por un operador con experiencia para adquirir datos idénticos. Por ejemplo, un FACSCAN, un clasificador de células Vantage, u otro producto BD funcionarían para recoger datos similares. Además, igualmente funcionarían los productos Coulter, tales como el Coulter Epic Sorter.

La configuración del instrumento dada más abajo puede usarse como una guía general para la configuración del instrumento para recoger los datos como se hizo en estos estudios. Estas configuraciones se usaron para los ejemplos proporcionados en la presente; sin embargo, pueden y deben realizarse modificaciones de estas configuraciones por un administrador experimentado del instrumento para ajustar adecuadamente la compensación y los voltajes del detector. Además, el uso de diferentes anticuerpos de detección con diferentes etiquetas fluorescentes requiere un ajuste único para cualquier instrumento en particular para dar una separación óptima de la señal (voltaje) con un mínimo de "pérdida" en otros canales (por ejemplo, compensación). Un operador de flujo experto, bien versado en el uso de controles de compensación, controles de isotipo, y con una comprensión general de la biología de las células T debe ser capaz de reproducir cualquiera de los datos que se presentan más abajo.

Además hay que señalar que diversas configuraciones, particularmente las configuraciones de voltaje, pueden variar, dependiendo de la eficiencia del láser del instrumento. Por ejemplo, los láseres más antiguos pueden requerir más voltaje para generar una señal comparable a la de un láser más nuevo. Sin embargo, los datos obtenidos, con más o menos voltaje, deben reflejar patrones similares en la biología.

Configuraciones usadas en el FACSCALIBUR™ (Becton Dickinson):

#### Detector/Amperes:

Parámetro	Detector	Voltaje	Amp/Ganancia	Modo
P1	FSC	EOO	1.30	Lin
P2	SSC	370	1.00	Lin

Parámetro	Detector	Voltaje	Amp/Ganancia	Modo
P3	FL1	610	1.00	Log
P4	FL2	550	1.00	Log
P5	FL3	520	1.00	Log

5 Aunque los voltajes de los parámetros son generalmente constantes, P3, P4, y P5 pueden ajustarse ligeramente hacia arriba o hacia abajo con el fin de alcanzar una separación máxima de la señal, mientras se mantiene un valor de la señal del control negativo en o cerca de la primera década (0 -10) en la intensidad de la señal en el modo de registro.

Umbral:

10 Parámetro primario: FSC (dispersión frontal)  
 Valor: 52  
 Parámetro secundario: ninguno

Compensación:

15 FL1 - 4.0% FL2  
 FL2 - 21.4% FL1  
 FL2 - 2.6% FL3  
 FL3 - 15.2% FL2

20 Si bien las configuraciones proporcionadas se aproximan a las configuraciones utilizadas para recoger la mayor parte de los datos presentados más abajo, las configuraciones pueden modificarse y deben generar datos más o menos equivalentes a las células T estimuladas. Los intervalos generales aceptables para la compensación a los voltajes enumerados anteriormente se muestran más abajo:

FL1-FL2	0.4-4%
FL2-FL1	18-27%
FL2-FL3	2-8%
FL3-FL2	10-16%

25 La determinación de la compensación o de los valores de voltaje particulares tiene que realizarse por un operador experimentado del citómetro de flujo con los siguientes objetivos:

- 30 1) Voltaje: Maximización de la separación de la señal entre las señales positivas y negativas (*por ejemplo*, marcador de antígeno de superficie negativo vs. niveles bajos de antígeno de superficie vs. niveles altos de antígeno de superficie).  
 2) Compensación: Minimización de la interferencia entre canales (pérdida) mediante el uso de controles de compensación.

35 A medida que cambian las configuraciones del voltaje, lo hacen también las configuraciones de la compensación.

EJEMPLO V

40 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR

La proliferación y la viabilidad celular se midieron por tinción estándar con azul tripán y conteo de células con el uso de un hemocitómetro. Ver Figuras 5A- y 5B.

45 EJEMPLO VI

ENSAYOS DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN

50 El CD154 se expresa en las células T activadas de una manera temporal y se ha visto que es un elemento clave en las interacciones de las células T a través de CD40 en las APCs. El bloqueo de la interacción de estos dos receptores puede alterar de manera efectiva, e incluso apagar, una respuesta inmune. En los días 3, 5, y 8 del cultivo celular se extrajeron alícuotas de células T que fueron estimuladas por concentración con perlas paramagnéticas 3x28 y se analizó el nivel de expresión de CD154. El nivel de expresión de CD154 se comparó con

las células T con reducción de monocitos pero no se incubaron con perlas paramagnéticas 3x28 (es decir, las células T no se concentraron magnéticamente al inicio del cultivo). La activación significativa de las células T estimuladas por concentración magnética con perlas anti-CD3 y anti-CD28 se demostró por un aumento de tres veces en el nivel de expresión de CD154 al tercer día del cultivo en comparación con las células que no se estimularon similarmente al inicio del cultivo. (Ver Figuras 4 y 7). Los niveles de CD25 medidos en una manera similar (Figura 6) muestran una tendencia hacia una mayor activación.

Generalmente, la expresión del marcador se registró varias veces. En este sentido las células se marcan con Ac anti-CD4 humano (Immunotech, Fullerton, CA), Ac anti-CD11a humano acoplado a FITC (Pharmingen), Ac anti-CD26 humano acoplado a FITC (Pharmingen), Ac anti-CD49d humano acoplado a FITC (Coulter), Ac anti-CD54 humano acoplado a FITC (Pharmingen y Becton Dickinson), Ac anti-CD95 humano acoplado a FITC (Pharmingen), Ac anti-CD134 humano acoplado a FITC (Pharmingen), Ac anti-CD25 humano acoplado a FITC (Becton Dickinson, Fullerton, CA), Ac anti-CD69 humano acoplado a FITC (Becton Dickinson), Ac anti-CD154 humano acoplado a FITC o PE (Becton Dickinson), o Ac control del isotipo IgG1 acoplado a FITC o PE. Las células,  $2 \times 10^5$  se marcan durante 20 minutos a 4°C con 2 µl de cada anticuerpo en un volumen final de 30 µl, se lavan y se resuspenden en paraformaldehído al 1% (Sigma, St. Louis, MO).

La comparación de los niveles de expresión de las moléculas marcadoras de la superficie celular puede llevarse a cabo por una variedad de métodos y así los valores absolutos pueden diferir. Sin embargo, cuando se comparan dos valores pueden calcularse fácilmente los valores de incremento relativo. Por ejemplo, los niveles de expresión de CD154 en células T generadas por diferentes métodos de "activación" pueden medirse con relativa precisión mediante citometría de flujo. Con el uso de un reactivo, tal como el conjugado anti-CD154 - PE de Becton Dickinson (# de catálogo 340477), se pueden teñir las células T en estados de reposo o activadas y medir los niveles de expresión para este marcador (u otros por medios bien conocidos por los operadores experimentados de un citómetro de flujo). En la presente se describen métodos que proporcionan una expresión aumentada de CD154 sobre células T, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Al estimular simultáneamente y concentrar las células T al inicio del cultivo, como se describe en la presente, los niveles de expresión pueden impulsarse más allá de los valores obtenidos por la activación estándar 3x28, en el orden de 20% a un aumento del 100% en los niveles, medido por la intensidad de fluorescencia media (MFI) con el uso de citometría de flujo (BD FACSCalibur y los anticuerpos descritos anteriormente). Por ejemplo, una célula T CD4<sup>+</sup> no estimulada sería negativa para CD154 y rendiría así, valores de MFI entre 1-10. Tras la activación por XCELLERATE I™, a los 3 días después de la activación, los valores de MFI para CD154 sobre células T CD4<sup>+</sup> pueden estar en el intervalo de 20-40, mientras que el proceso XCELLERATE II™ podría producir valores de MFI para CD154 de 60-200. Si bien estos no son valores absolutos en términos del número de moléculas CD154 expresadas sobre las células T, son suficientes para determinar los niveles relativos de aumento de la expresión. En consecuencia, puede demostrarse un incremento aproximado de 1.1 a 20 veces en los niveles de CD154 entre 1-4 días, después de la activación con el proceso XCELLERATE II™ en comparación con el proceso XCELLERATE I™.

#### EJEMPLO VII

##### ENSAYOS DE CITOCINA

Las células se preparan como se describe anteriormente. Los sobrenadantes de las células estimuladas varias veces son sometidos a un ELISA de IL-2, IL-4, INF-gamma o TNF-α de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biosource International, Sunnyvale, CA).

En un ensayo alternativo, la IL-2 se mide por tinción intracelular de las células T CD4 usando citometría de flujo. Para el marcaje intracelular de IL-2 o IFN-γ, primero las células se incuban con 1 µml de Monensina (Calbiochem) durante 4 horas antes del ensayo. Posteriormente las células se tiñen para proteínas de la superficie como se describió anteriormente, se fijan y se permeabilizan usando el kit de tinción intracelular de Becton Dickinson, marcados con un Ac anti-IL-2 humana acoplado a PE y un Ac anti-IFN-γ humano acoplado a FITC o los Acs de control correspondientes como se describe por el fabricante. La adquisición de datos y el análisis de citometría de flujo se realizan en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCalibur usando el software Cellquest según el protocolo del fabricante (Becton Dickinson).

Las concentraciones de IFN-gamma estuvieron alrededor de 2, 3, 4, y en algunos casos 5 veces más altas en el día 3 cuando se utiliza la metodología XCELLERATE II™ en comparación con XCELLERATE I™ (datos no mostrados). Más aún, los niveles de TNF-alfa fueron además marcadamente más altos (entre 1.5 a 3 veces más altos) hasta el día 5 después de la estimulación (datos no mostrados) en comparación con XCELLERATE I™.

#### EJEMPLO VIII

##### ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS CÉLULAS DESPUÉS DE LA RE-ESTIMULACIÓN

Para el análisis de la re-estimulación se toman aproximadamente  $5 \times 10^6$  células del cultivo en el día de terminación. En varios ejemplos, la fecha de terminación es el día 8 del cultivo. Las células se colocan en 5 ml de

medio X-vivo 15 con suero y con IL-2 o sin ella como se indicó anteriormente, en un pocillo de una placa de seis pocillos. Aproximadamente  $5 \times 10^6$  perlas Dynabeads M-450 CD3/CD28 T se añaden en el pocillo que contiene las células, y las células y las perlas se colocan en una incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Después de dos días, las muestras se extraen y se estudia la viabilidad y se analizan por FACS para determinar el tamaño celular, y el marcador de células y/o los niveles de expresión de citocinas, tales como los niveles de expresión de CD25, los niveles de expresión de CD154. La Tabla 6 más abajo demuestra estos resultados para cinco muestras de pacientes sometidos a los procesos XCELLERATE I™ y XCELLERATE II™.

Tabla 6: Resultados del ensayo de re-estimulación de células T XCELLERATED producidas con el uso de los procesos XCELLERATE I™ y XCELLERATE II™

Número del experimento (donante)	Configuración del proceso	Tamaño de las células (FSC)		CD25 (MFI)		CD154 (MFI)	
		T = 0	T = 48 h	T = 0	T = 48 h	T = 0	T = 48 h
NDa104 (PC071)	XCELLERATE I	393	607	104	478	6	37
	XCELLERATE II	404	659	115	544	12	70
T = 0	T = 48 h	T=0	T= 48 h	T=0	T= 48 h		
NDa107 (PC074)	XCELLERATE I	386	596	59	585	6	121
	XCELLERATE II	380	607	62	721	10	109
NDa110 (PC076)	XCELLERATE I	425	501	111	600	10	39
	XCELLERATE II	390	445	97	434	15	36
NDa113 (PC060)	XCELLERATE I	399	630	66	659	8	32
	XCELLERATE II	411	633	113	816	12	145
NDa115 (PC073)	XCELLERATE I	433	514	105	247	13	10
	XCELLERATE II	408	569	81	369	20	36
Promedio ± Desv. Est. (n = 5)	XCELLERATE I	407 ± 21	570 ± 58	89 ± 24	514 ± 163	9 ± 3	48 ± 43
	XCELLERATE II	399 ± 13	583 ± 84	94 ± 22	577 ± 189	14 ± 4	79 ± 48

#### EJEMPLO IX

#### 15 EXTRACCIÓN CELULAR ALTERNATIVA Y PROTOCOLOS DE CULTIVO XCELLERATE™

Las células aisladas de sangre humana se cultivan en medio X-vivo (Biowhittaker Inc, Walkersville, MD) y en dependencia del uso se suplementa con o sin 20 U/ml de IL-2 (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) y se suplementa con 5% suero humano (Biowhittaker), glutamina 2 mM (Life Technologies, Rockville, MD) y HEPES 20 mM (Life Technology). Las células Jurkat E6-1 (ATCC, Manassas, VA) se cultivan en RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado con FBS 10% (Biowhittaker), glutamina 2 mM (Life Technologies), penicilina 2 mM (Life Technologies), y estreptomycin 2 mM (Life Technologies).

25 Las capas leucocitarias se obtienen de donantes voluntarios humanos sanos (American Red Cross, Portland, OR). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtienen usando Medio de Separación de Linfocitos (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 Los linfocitos de sangre periférica (PBL) se obtienen de la fracción de PBMC por incubación en un frasco de cultivo (Costar, Pittsburgh, PA) con Dynabeads no recubiertas (DynaL, Oslo, Noruega),  $10^8$  células/ml, 2 perlas/célula, 2 h a 37°C. Los monocitos y los macrófagos pueden eliminarse por adherencia al frasco de cultivo. Alternativamente, pueden eliminarse por fagocitar las perlas paramagnéticas y después reducir estas células por separación celular magnética de acuerdo con las instrucciones del fabricante (DynaL). Las células CD4<sup>+</sup> se purifican a partir de la fracción de PBL por incubación con 10 µg/ml de anticuerpos monoclonales contra CD8 (clon G10-1), CD20 (clon IF5), CD14 (clon F13) y CD16 (Coulter),  $10^8$  células/ml, 20 min a 4°C. Después del lavado, las células se tratan con Dynabeads acopladas con Ac de oveja anti-Ig de ratón ( $10^6$  células/ml, 6 perlas/célula, 20 min a 4°C) y después se reducen dos veces mediante separación celular magnética. La pureza de las células CD4<sup>+</sup> rutinariamente es de 91-95% medida mediante citometría de flujo.

Las células dendríticas se generan al adherir primero las PBMC al frasco de cultivo (Costar),  $10^8$  células/ml, 2 horas

a 37°C (sin Dynabeads). Después de un extenso lavado, las células adherentes se cultivan durante 7 días en un medio que contiene 500 U/ml de GM-CSF (Boehringer Mannheim) y 12.5 U/ml de IL-4 (Boehringer Mannheim). La población de células resultante es débilmente adherente y expresa marcadores de superficie característicos de las células dendríticas (por ejemplo, expresa HLA-DR, CD86, CD83, CD11c y carece de la expresión de CD4). (Todos los anticuerpos se obtuvieron de Becton Dickinson, San José, CA).

Otras técnicas pueden utilizar linfocitos de sangre periférica humana que contienen células T que se incuban en placas de cultivo de tejidos y/o en frascos de cultivo de tejidos (bolsas Baxter), u otros recipientes de cultivo comunes, en medios que podrían estar compuestos de RPMI, X-Vivo 15, o algunos otros medios de cultivo de células T. Aunque no es necesario para la activación y el crecimiento de las células T, se añade glutamina y HEPES a los medios de cultivo. Se añade suero fetal bovino (10% final), suero humano A/B (5%), o suero humano autólogo (5%) a los medios de cultivo. El porcentaje de suero puede variar sin afectar en gran medida la biología de las células T o el resultado del cultivo. En algunos casos, se añade IL-2 humana recombinante a los cultivos. En algunos casos, las células fagocíticas CD14+ y otras células fagocíticas se eliminan por reducción magnética como se describe, *más abajo*. Las perlas que tienen Ac anti-CD3 y anti-CD28 co-inmovilizados sobre su superficie (perlas 3x28) se añaden en una relación perla:célula de 3:1. En algunos casos, las perlas 3x28 se añaden en una relación perla:célula de 1:1. En otros casos, las perlas 3x28 se añaden secuencialmente durante los primeros 5 días de cultivo con relaciones finales de 1:1 el día 1, 1:5 los días 3 y 5. Los cultivos se mantienen a 37 grados C en 5-7% de CO<sub>2</sub>. Las células se extraen en varios puntos de tiempo durante un período de 14 días para determinar la densidad celular (número de células), tamaño celular, y fenotipo de la superficie celular medido mediante análisis de citometría de flujo de una variedad de antígenos de superficie. Además los sobrenadantes se recogen a partir de los cultivos para determinar los perfiles de secreción de citocinas, que incluyen, pero sin limitarse a: IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . En la medida que las células activadas crecen y se dividen, los cultivos se mantienen a 0.2-2x10<sup>6</sup> células TCD3<sup>+</sup>/ml. Cuando la densidad de células T excede más o menos 1.5x10<sup>6</sup>/ml, los cultivos se dividen y se alimentan con medio fresco para dar una densidad celular en el intervalo de 0.2-1.4x10<sup>6</sup>/ml. En más o menos 2 horas a aproximadamente 14 días después de la estimulación inicial, cuando las células T activadas se muestran que entran en una fase de mayor reposo (*por ejemplo*, los niveles de CD25 disminuyen, el tamaño celular disminuye al determinarse por dispersión frontal, la velocidad de división celular puede estar reducida), las células se infunden al sujeto o se re-estimulan con uno de los siguientes estímulos:

- 1) Sin estímulo
- 2) Fitohemaglutinina (PHA) 2  $\mu$ g/ml
- 3) (perlas 3x28) en una relación perla/célula de 1:1

El fenotipo celular y el estado de activación/funcional de las células se analizan de nuevo en el tiempo. Los sobrenadantes se recogen de nuevo para el análisis de citocinas secretadas. Las células se estimularon por tres metodologías diferentes: 1) Dynabeads (M-450) acopladas covalentemente a anticuerpos anti-CD3 (OKT-3) y anti-CD28 (9.3) (perlas 3x28) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Dyna), 3 perlas/célula, 2) Ionomicina (Calbiochem, La Jolla, CA) (100 ng/ml) y 12- miristato-13-acetato de forbol (PMA) (Calbiochem) (10 ng/ml), 3) células dendríticas alogénicas (25,000 células dendríticas/200,000 células CD4). Todas las células se estimulan a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml. Los ensayos de proliferación se llevan a cabo por cuadruplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano. Las células se estimulan a 10<sup>6</sup> células/ml en un volumen final de 200  $\mu$ l. La proliferación se mide mediante un ensayo MTT (kit de ensayo MTT, Chemicon International Inc, Temecula, CA) el día 3 (método de estimulación 1 y 2) o el día 6 (método de estimulación 3), y los resultados se presentan como valor promedio de los cuadruplicados. Los cultivos de PBL o cultivos de células CD4<sup>+</sup> purificadas se estimulan con perlas 3x28, ionomicina/PMA, o células dendríticas alogénicas.

Como se demuestra mediante las Figuras 8A-8B, el número de células (contador Coulter) aumenta dramáticamente después de la estimulación con PHA, perlas 3x28, (anti-CD3 y anti-CD28 co-inmovilizados en perlas) unido a las perlas mediante un Ac de oveja anti-ratón (SAM), perlas 3x28 con los anticuerpos unidos covalentemente a las perlas, o anticuerpos inmovilizados de manera individual o dual sobre una placa. La Figura 9 demuestra además aumentos en los números de células después de la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados covalentemente sobre perlas +/- reducción de monocitos y +/-20 unidades de IL-2.

## EJEMPLO X

### REDUCCIÓN DE MONOCITOS MEDIANTE REDUCCIÓN MAGNÉTICA

Los monocitos (células fagocíticas CD14<sup>+</sup>) se eliminan de las preparaciones de células T mediante una reducción magnética con el uso de una variedad de perlas Dynal "irrelevantes" (es decir, sin recubrimiento con anticuerpo o sin recubrimiento con anticuerpo diana). La reducción se realizó por incubación previa de sangre total separada en ficoll, o sangre periférica de aféresis con una relación de perlas a células de más o menos 2:1 de perlas Dynal de oveja anti-ratón M-450, o perlas Dynal recubiertas con albúmina sérica humana (M-450), o con perlas Dynal Epoxi (M-450) por períodos de 1-2 horas a 22-37 grados C, seguido de la eliminación magnética de las células que se unieron a las perlas o que envolvieron a las perlas. Las células restantes se colocaron en cultivo junto con las células no

manipuladas. El fenotipo de las células se caracterizó mediante citometría de flujo antes y después de la reducción. La Figura 9 demuestra un aumento de la proliferación en ausencia de monocitos.

#### EJEMPLO XI

#### 5 ESTUDIOS EN EL TIEMPO DE LA CINÉTICA DE ACTIVACIÓN PREVIA Y ACTIVACIÓN POSTERIOR

Se llevaron a cabo una serie de experimentos en que las células T humanas, aisladas a partir de sangre total o de sangre periférica de aféresis, se cultivaron bajo una variedad de condiciones. Esas condiciones incluyen:

- 1) Sin estimulación
- 2) Estimulación con fitohemaglutinina (PHA) a 2 µg/ml.
- 3) Estimulación con Dynabeads 3x28 (perlas que tienen perlas anti-CD3 y anti-C28 conjugadas a ellas) en una relación de perlas con respecto a células T de 3:1 o 1:1.
- 15 4) Estimulación o cultivo en la presencia o ausencia de IL-2 humana recombinante añadida de manera exógena a 10 U/ml (5 ng/ml).
- 20 5) Cultivo en la presencia de monocitos (células fagocíticas CD14<sup>+</sup>) o cultivadas después de la eliminación de las células antes mencionadas mediante reducción magnética con el uso de una variedad de Dynabeads "irrelevantes". La reducción se realizó como se ilustra en el Ejemplo II.

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

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

Los linfocitos de sangre periférica humana que contienen células T se prepararon tal como se describe en el Ejemplo IX. El fenotipo celular y el estado de activación/funcional de las células se analizan en el tiempo. Los sobrenadantes se recogen para el análisis de citocinas secretadas. Las Figuras 8 y 9 demuestran las características generales de crecimiento de las células T humanas después de la activación con perlas 3x28+IL-2 humana recombinante en 10u/ml y +/- reducción de monocitos. Todas las células se cultivaron en frascos Baxter Lifecell (300ml). El gráfico marcado como "Escalado" se refiere a un frasco de cultivo de 300ml (Sin IL-2/reducción de monocitos) que se expandió hasta un frasco de 3 litros Baxter Lifecell. El gráfico demuestra una expansión aproximada de 2-4 log de las células T humanas bajo las diversas condiciones.

La Figura 10 muestra el análisis de la cinética del tamaño celular determinado mediante los perfiles de dispersión frontal de citometría de flujo en el tiempo. Se observa que las células T aumentan de tamaño poco después de la activación y posteriormente disminuyen de tamaño de manera que hacia el día 14 demuestran perfiles más pequeños de dispersión frontal, lo que indica un estado de mayor reposo.

La Figura 11 muestra la expresión del receptor de IL-2 (CD25) en el tiempo después de la estimulación con perlas 3x28. Ambas células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> muestran un aumento temprano en el nivel del receptor. Hacia el día 14, los niveles de expresión de CD25 se reducen grandemente en una mayoría de las células T, lo que indica un estado de mayor reposo.

Cuando las células T estimuladas con 3x28 entran en un mayor reposo (bajo CD25, baja dispersión frontal), se re-estimularon como se muestra más abajo:

- 1) Sin estimulación
- 2) PHA 2ug/ml
- 3) Estimulación con perlas (Xcellerate) 3x28 a 1 perla/célula T CD3<sup>+</sup>

Después se realizó un análisis de la cinética del tamaño celular (dispersión frontal), el fenotipo de superficie, la expresión de marcadores de activación, y la secreción de citocinas. La Figura 12 muestra cinéticas de dispersión frontal (tamaño celular) después de la estimulación primaria y secundaria. La Figura 13 muestra cinéticas de expresión de CD25 (receptor de IL-2) después de la estimulación primaria y secundaria. La Figura 16 muestra la expresión de CD54 (I-CAM) después de la estimulación secundaria, en células T CD4<sup>+</sup> (A) y en células T CD8<sup>+</sup> (B), donde la estimulación primaria fue con PHA o perlas 3x28, y re-estimulación fue: ninguna, PHA, o perlas 3x28. Los marcadores que delimitan entre las células CD4 y CD8 positivas se usaron además para determinar su proporción relativa durante la activación por perlas con anticuerpo 3x28 (Figuras 19 y 22).

## EJEMPLO XII

## ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE CITOCINAS DE LAS CÉLULAS T CO-ESTIMULADAS

5 El papel de una variedad de citocinas, que incluyen IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-4 se han estudiado ampliamente ya que se relacionan con el mantenimiento, la expansión, y la diferenciación de las células T. De manera notable, se ha demostrado que la IL- 2 apoya el mantenimiento y la expansión de las células T. El IFN- $\gamma$  se ha implicado en impulsar a las células T para diferenciarse en respuestas inmunes tipo T<sub>H1</sub>, mientras que la IL-4 se ha implicado en la conducción de células T hacia respuestas tipo T<sub>H2</sub>. Los niveles de liberación de citocinas en células T humanas primarias activadas por PHA o perlas 3x28 se analizaron mediante la estimulación de células T como en el Ejemplo IX, que incluye estudios cinéticos de las respuestas a una estimulación primaria y respuestas a un estímulo secundario. Los datos se muestran en las Figuras 18A-C y las Figuras 23-24 y demuestran una característica única de la estimulación por perlas 3x28. Entre el día 2 y el día 4 después de la estimulación inicial (el día uno no se evaluó), se observaron niveles extremadamente altos de IL- 2 e IFN- $\gamma$ . Se observó un aumento de casi 5 veces en los niveles absolutos de IL-2 secretada por las células T estimuladas con perlas 3x28 en comparación con los niveles observados en las células estimuladas con PHA. Además se observó un aumento aproximado de 7 veces en los niveles de IFN $\gamma$  células T estimuladas con 3x28 en comparación con sus contrapartes con PHA. En el caso de la IL-4, el aumento no fue tan dramático para la estimulación primaria. Curiosamente, y posiblemente de gran importancia, es que luego que las células entraron en reposo (no se dividieron más ni secretaron las tres citocinas mencionadas anteriormente) después de la estimulación primaria, se re-estimularon con perlas 3x28, PHA, o se dejaron sin estimulación. Las células T que habían recibido una señal de activación/expansión inicial a través de perlas 3x28, secretaron niveles aún más altos de IFN- $\gamma$  que los observados después de la estimulación primaria. En contraste, las células que inicialmente se estimularon con PHA secretaron niveles de IFN- $\gamma$  mucho más bajos que los observados para sus contrapartes 3x28. Además se observaron diferencias similares para los niveles de IL-4.

25 Estos datos sugieren que las células obtenidas después de la activación/expansión mediada a través de perlas 3x28, son funcionalmente diferentes que las obtenidas a partir de otros medios de expansión, tales como PHA. Las células resultantes parecen tener una respuesta de secreción de citocinas alterada, la que promueve niveles muy altos tanto de citocinas T<sub>H1</sub> como T<sub>H2</sub>, con una posible preferencia del perfil tipo T<sub>H1</sub> (IFN- $\gamma$ ). La secreción de tales niveles altos de estas citocinas en cultivo puede tener muchos efectos, que incluyen: impulsar las células T a una vía de diferenciación hacia T<sub>H1</sub>, que es una que favorece respuestas anti-tumorales y anti-virales, y además alterar la funcionalidad básica de las células T resultantes (tal como reducir el umbral de activación e inhibir vías de muerte celular programada).

## 35 EJEMPLO XIII

## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD54 DE CÉLULAS CO-ESTIMULADAS

40 La Figura 16 muestra la expresión de CD54 (I-CAM) después de la estimulación secundaria, en células T CD4<sup>+</sup> (A) y en células T CD8<sup>+</sup> (B), donde la estimulación primaria fue con PHA o perlas 3x28, y re-estimulación fue: ninguna, PHA, o perlas 3x28.

## EJEMPLO XIV

## 45 ENSAYOS A CORTO PLAZO DE LOS MARCADORES DE ACTIVACIÓN

50 La expresión de marcadores se registró en varios tiempos después de la estimulación de las células T como se expone en el Ejemplo IX. En este sentido las células se marcan con anti-CD4 humano (Immunotech, Fullerton, CA), anti-CD11a humano acoplado a FITC (Pharmingen), anti-CD26 humano acoplado con FITC-(Pharmingen), anti-CD49d humano acoplado con FITC (Coulter), anti-CD54 humano acoplado con FITC (Pharmingen y Becton Dickinson), anti-CD95 humano acoplado con FITC (Pharmingen), anti-CD134 humano acoplado con FITC (Pharmingen), Ac anti-CD25 humano acoplado con FITC (Becton Dickinson, Fullerton, CA), Ac anti-CD69 humano acoplado con FITC (Becton Dickinson), Ac anti-CD154 humano acoplado con FITC o PE (Becton Dickinson), o Ac control del isotipo IgG1 acoplado con FITC o PE. Las células, 2x10<sup>5</sup> se marcan durante 20 minutos a 4°C con 2  $\mu$ l de cada anticuerpo en un volumen final de 30  $\mu$ l, se lavan y se resuspenden en paraformaldehído al 1% (Sigma, St. Louis, MO). Ver las Figuras 21-22, y 26A-26L, como se demuestra mediante estas figuras aparecen diferencias significativas en el tiempo de activación, así como también entre las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

## 60 EJEMPLO XV

## EXPANSIÓN DE CÉLULAS T USANDO RELACIONES VARIABLES DE CD3:CD28

65 La expansión de células T se evaluó con el uso de concentraciones variables de relaciones CD3:CD28 en las 3x28 DYNABEADS® M-450. En los experimentos descritos en la presente, se utilizó el proceso referido como XCELLERATE II™, como se describe en el Ejemplo I. Como se muestra en la Figura 27, sorprendentemente, se observó una expansión de aproximadamente 68 veces después de 8 días de cultivo con una relación CD3:CD28 de

1:10 sobre las perlas. Se observó una expansión de las células T de 35 veces después de 8 días de cultivo con una relación CD3:CD28 de 1:3 sobre las perlas. Con una relación de 1:1, se observó una expansión de aproximadamente 24 veces.

5 EJEMPLO XVI

EXPANSIÓN DE CÉLULAS T CON EL USO DE RELACIONES VARIABLES PERLA:CÉLULA T PARA LA SELECCIÓN POSITIVA SEGUIDA POR CANTIDADES VARIABLES DE UNA ADICIÓN SECUENCIAL DE PERLAS

10 Este ejemplo describe modificaciones al proceso EXCELLERATE II™ (ver Ejemplo I) para determinar las relaciones perlas: células T más eficaces para la selección positiva y para la expansión óptima de las células T a través de los primeros 10 días después de la estimulación.

15 En el primer experimento, se hicieron comparaciones de las células seleccionadas positivamente con una relación perlas 3x28: células de 1:1 y estimuladas con relaciones variables de perlas 3x28 añadidas secuencialmente en los primeros 10 días de estimulación. Las células se seleccionaron positivamente con 3x28 DYNABEADS® M-450 en relaciones perla:célula T de 3:1 y 1:1. Para la relación de 3:1, 20 X 10<sup>6</sup> células (suponiendo un 50-60% de células T) se aislaron y se resuspendieron en 1 ml de PBS + suero humano al 5%. Se añadieron 30 X 10<sup>6</sup> perlas lavadas para un volumen total de 2 mls. Para la relación de 1:1, se añadieron 10 X 10<sup>6</sup> perlas lavadas a los 10 X 10<sup>6</sup> de células  
 20 totales. Las células se cultivaron en frascos T-25 y el día 3, se contaron y se dividieron en placas de 6 pocillos en un volumen de 5 ml. El día 5, todos los pozos se dividieron en 1.25 X 10<sup>6</sup> células/pocillo. En los días 3, 4 y 6-9, todos los pocillos se dividieron en 2.5 X 10<sup>6</sup> células/pocillo. Después las perlas 3x28 se añadieron secuencialmente a las células seleccionadas positivamente en una relación perlas:células de 1:1. Como se resume en la Tabla 7, los rendimientos celulares en el día 10 fueron más altos con la adición secuencial de las perlas los días 3, 4, y 5 en una  
 25 relación final de 0.2:1.

Tabla 7: Rendimiento celular el día 10 después de la adición secuencial variable de perlas 3x28

Relación para la selección positiva (perlas:células)	Relación de las perlas añadidas secuencialmente (perlas:células)	Rendimiento celular X 10 <sup>6</sup> el día 10
3:1 Selección	Ninguno	4,300
1:1 Selección	Ninguno	2,600
1:1 Selección	0.33:1 en D1 & 2	6,700
1:1 Selección	0.2:1 en D1 & 2	4,000
1:1 Selección	0.2:1 en D1-5	9,600
1:1 Selección	0.2:1 en D3-5	11,400

30 En un segundo experimento, se variaron los tiempos de selección positiva de 0.5-1.0 horas y las relaciones perla:célula variaron de 3:1 a 1:1. Como se resume en la Tabla 8, el rendimiento celular más alto a los 10 días se obtuvo con una selección con la relación perla:célula de 1:1 durante 60 minutos y la adición secuencial de perlas en una relación de 0.2:1 los días 3 y 5. Cabe señalar sin embargo, que la selección de una relación perla:célula de 3:1 durante 30 minutos dio los mayores rendimientos de selección positiva.

35 Tabla 8: Rendimiento celular el día 10 al variar las relaciones de selección positiva, los tiempos y la adición secuencial de perlas 3x28

Relación perla:célula para la selección positiva	Tiempo de selección positiva	Relación de perlas añadidas secuencialmente (perlas:células)	Rendimiento celular X 10 <sup>6</sup> el día 10
3:1	30 minutos	0.2:1 en D3	5,100
1:1	30 minutos	Ninguno	3,300
1:1	30 minutos	0.2:1 en D3	4,400
1:1	30 minutos	0.2:1 en D3 & D5	5,700
1:1	30 minutos	0.2:1 en D3, 4, & 5	6,700
1:1	60 minutos	Ninguno	3,400
1:1	60 minutos	0.2:1 en D3	4,800
1:1	60 minutos	0.2:1 en D3 & D5	9,000
1:1	60 minutos	0.2:1 en D3, 4, & 5	7,900

## EJEMPLO XVII

## EXPANSIÓN DE CÉLULAS T CON EL USO DE XCELLERATE II™ Y EL BIORREACTOR WAVE

5 Este ejemplo describe la expansión de células T con el uso del proceso Xcellerate IIb seguido de la siembra de las células en el biorreactor WAVE.

10 **Día 0 del proceso Xcellerate** - El primer día del proceso Xcellerate esencialmente como se describe en el Ejemplo I, el número necesario de contenedores Cryocte™ crioconservados se extrajeron del congelador de almacenamiento, se descongelaron, se lavaron y se filtraron.

15 **Día 0** - Después se mezcló un volumen de células que contenía aproximadamente  $0.5 \times 10^9$  células CD3<sup>+</sup> con Dynabeads M-450 CD3/CD28 T en una relación de Dynabeads M-450 CD3/CD28 T: células T CD3<sup>+</sup> de 3:1 y se incubaron con rotación. Después de la incubación, las células T CD3<sup>+</sup> se concentraron magnéticamente y se activaron simultáneamente. Las células T CD3<sup>+</sup> se resuspendieron después en medio completo en una Bolsa de Cultivo Celular Lifecell. La bolsa que contenía las células y las perlas se colocó después en una incubadora dedicada a pacientes (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>).

20 **En el día 3 o alrededor de éste** - Las células CD3<sup>+</sup> se expandieron en cultivo durante ≈3 días en que los contenidos de la bolsa única se dividen en 4 nuevas bolsas Lifecell. Las 4 bolsas se retornaron después a la incubadora dedicada a pacientes (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>).

25 **En el día 5 o alrededor de este** - Las células CD3<sup>+</sup> se expandieron en cultivo durante 2 días adicionales momento en que los contenidos de las bolsas de cultivo se sembraron después en un Biorreactor Wave de 20 L que contiene un volumen de medio de 10 L. Las células se cultivaron después a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> con el movimiento de ondas a 15 oscilaciones/minuto y con una perfusión de 1 ml/minuto.

30 Los conteos celulares se determinaron cada día y se compararon con las células estimuladas y expandidas con el uso del proceso estático Xcellerate II. Como se muestra en la Figura 28, la expansión mejoró dramáticamente cuando las células se cultivaron en el Biorreactor Wave. Más aún, las densidades celulares alcanzaron valores tan altos como  $50 \times 10^6$  células/ml en el Biorreactor Wave, en comparación con una densidad celular máxima de  $5 \times 10^6$  observada en el proceso estático Xcellerate II. Un conteo celular total de aproximadamente 800 mil millones se alcanzó el día 12 de cultivo a partir de un conteo celular inicial de aproximadamente  $0.5 \times 10^9$  células, con el uso del Biorreactor Wave.

35 Así, el Biorreactor Wave proporciona una mejora inesperada y dramática al proceso de expansión. Además, las densidades celulares observadas hasta ahora y los rendimientos celulares absolutos finales se alcanzaron con el uso del Biorreactor Wave.

## 40 EJEMPLO XVIII

## PROTOSALOS ALTERNATIVOS PARA LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS T CON EL USO DEL BIORREACTOR WAVE

45 Se han desarrollado estrategias de estimulación/activación y expansión alternativa de células T con el uso del Biorreactor Wave, o sistemas biorreactores comparables, para alcanzar altas densidades celulares y altos rendimientos celulares finales.

50 En una estrategia, las células se descongelan y se lavan y la selección positiva se inicia como se describe en el proceso Xcellerate II. Las células seleccionadas positivamente se transfieren a una bolsa Wave de 2 litros sobre la plataforma oscilante. El volumen se aumenta a 1 litro mediante la introducción de medio completo en la bolsa a través del tubo de salida. La bolsa se incuba después en la plataforma Wave, sin oscilación, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. El día 3, se inicia una oscilación suave (5-10 oscilaciones/minuto). Los días 4-5, los contenidos se transfieren a una bolsa Wave de 20 litros, y el volumen se aumenta a 4 litros. El sistema de suministro de fluido se configura para aumentar el volumen de la bolsa en 2 litros por día. Los días 7-8, la perfusión se inicia de aproximadamente 0.5-3 ml/minuto y la bomba de salida se configura para mantener el volumen de la bolsa en 10 litros. Del día 9 al día 12, las células se cosechan: el sistema de suministro de fluido se desconecta y los 5 litros de sobrenadante se extraen a través de la bomba de salida. El imán angular se une a la línea de salida. Se permite que el producto celular expandido fluya fuera de la bolsa de 20 litros hacia paquetes de transferencia. El producto celular expandido sin perlas se procesa y se crioconserva.

65 En una estrategia alternativa, las células se descongelan y se lavan y se seleccionan positivamente como se describe en el proceso Xcellerate II, pero al doble de la concentración de células y perlas. Las células seleccionadas positivamente se transfieren a una bolsa Wave de 20 litros sobre la plataforma oscilante. El volumen se aumenta a 2 litros al introducir medio completo en la bolsa a través del tubo de salida. La bolsa se incuba después en la plataforma Wave, sin oscilación, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. El día 3, se inicia una oscilación suave (5-10

oscilaciones/minuto) y el volumen se incrementa a 6 litros. El día 4, el sistema de suministro de fluido se configura para aumentar el volumen de la bolsa a 2 litros por día. El día 6, la perfusión se inicia de aproximadamente 0.5-3 ml/minuto y la bomba de salida se configura para mantener el volumen de la bolsa en 10 litros. Del día 9 al día 12, las células se cosechan: el sistema de suministro de fluido se desconecta y los 5 litros de sobrenadante se extraen a través de la bomba de salida. El imán angular se une a la línea de salida. Se permite que el producto celular expandido fluya fuera de la bolsa de 20 litros hacia paquetes de transferencia. El producto celular expandido sin perlas se procesa y se crioconserva.

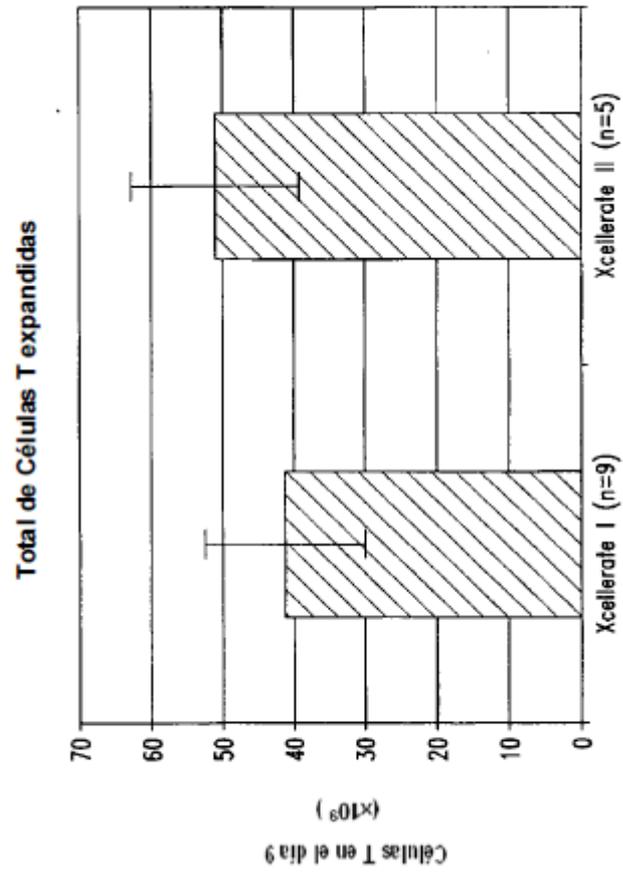
10 Todas las patentes anteriores de los Estados Unidos, las publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos, las solicitudes de patentes de los Estados Unidos, las patentes extranjeras, las solicitudes de patentes extranjeras y las publicaciones sin patente referidas en esta especificación y/o enumeradas en la Hoja de Datos de la Solicitud, que incluyen, pero sin limitarse a la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 09/960,264, presentada el 20 de septiembre de 2001; que es una continuación en parte de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 09/794,230, presentada el 26 de febrero de 2001; que reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales núm. 60/184,788, presentada el 24 de febrero de 2000, y 60/249,902, presentada el 17 de noviembre de 2000, se incorporan en la presente como referencia, en su totalidad.

20 A partir de lo anterior se apreciará que, aunque las modalidades específicas de la invención se han descrito en la presente con fines ilustrativos, pueden hacerse diversas modificaciones sin desviarse del espíritu y alcance de la invención. En consecuencia, la invención no se limita excepto por las reivindicaciones adjuntas. Aún más, todos los intervalos numéricos mencionados en la presente incluyen explícitamente todos los valores enteros dentro del intervalo.

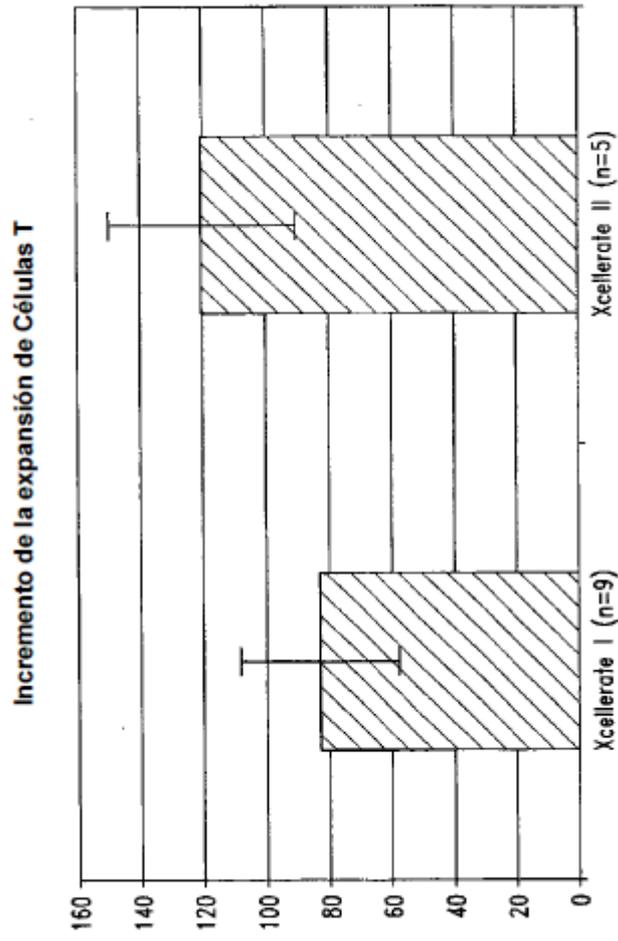
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para expandir una población de células T mediante la ligación de una porción de superficie celular, que comprende:
- 10 a. proporcionar una población de células;  
 b. poner en contacto dicha población de células con una superficie, en donde dicha superficie tiene unido a ella un primer agente que liga una primera porción de la superficie de la célula T y un segundo agente que liga una segunda porción de la superficie de la célula T, en donde dicha ligación por el primer y segundo agente induce la proliferación de dichas células T y en donde dicho primer agente es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de anticuerpo de este, y dicho segundo agente es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de este;  
 15 c. expandir dichas células en un sistema cerrado, en donde dichas células se expanden a una concentración de entre  $6 \times 10^6$  células/ml y  $90 \times 10^6$  células/ml en menos de dos semanas,
- 20 en donde dicho sistema de cierre comprende un biorreactor como recipiente de cultivo posicionado sobre una plataforma oscilante, en donde dicha plataforma oscilante se inicia aproximadamente en el día 3 a aproximadamente 5 a 15 oscilaciones/minuto y en donde la velocidad y el ángulo de dicha plataforma oscilante son variables.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en donde dichas células T se derivan de un único individuo y en donde dichas células T se expanden a partir de un número de partida de  $100-500 \times 10^6$  células hasta un total de  $100-500 \times 10^9$  células en menos de dos semanas.
- 30 3. El método de la reivindicación 2, en donde dichas células T alcanzan una concentración de  $50 \times 10^6$  células/ml en menos de dos semanas.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde dichas células T alcanzan una concentración de  $40-80 \times 10^6$  células/ml hacia el día 12.
- 35 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde dichas células T alcanzan una concentración de  $40-80 \times 10^6$  células/ml hacia el día 9.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde dichas células T alcanzan una concentración de  $40-80 \times 10^6$  células/ml hacia el día 7.
- 40 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde dichas células T se expanden en al menos aproximadamente 1.5 veces en aproximadamente 24 horas de aproximadamente el día 5 a aproximadamente el día 12.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a la 7, en donde dicha población de células T se siembra en un recipiente de cultivo que retiene un volumen de aproximadamente 0.1 litros a aproximadamente 200 litros.
- 45 9. El método de la reivindicación 8, en donde dicho recipiente de cultivo comprende al menos un filtro de entrada y un filtro de salida.
- 50 10. El método de la reivindicación 8, en donde dicha población de células T se siembra a una concentración inicial de  $0.1-0.5 \times 10^6$  células/ml.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 10, en donde dicho sistema cerrado comprende un recipiente que comprende al menos un filtro de entrada, un filtro de salida, y un puerto de muestreo.
- 55 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 11, en donde el medio de cultivo se perfunde a través de dicho sistema cerrado.
13. El método de la reivindicación 12, en donde dicha perfusión se inicia a una velocidad de 0.5 ml/minuto a 3.0ml/minuto el día 4, el día 6 o el día 8.
- 60 14. El método de la reivindicación 12, en donde dicho medio se selecciona del grupo que consiste de RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20.
- 65 15. El método de la reivindicación 12, en donde dicho medio de cultivo comprende uno o más de los siguientes: una citocina, una vitamina, un surfactante, un anticuerpo, plasmanato o un agente reductor.

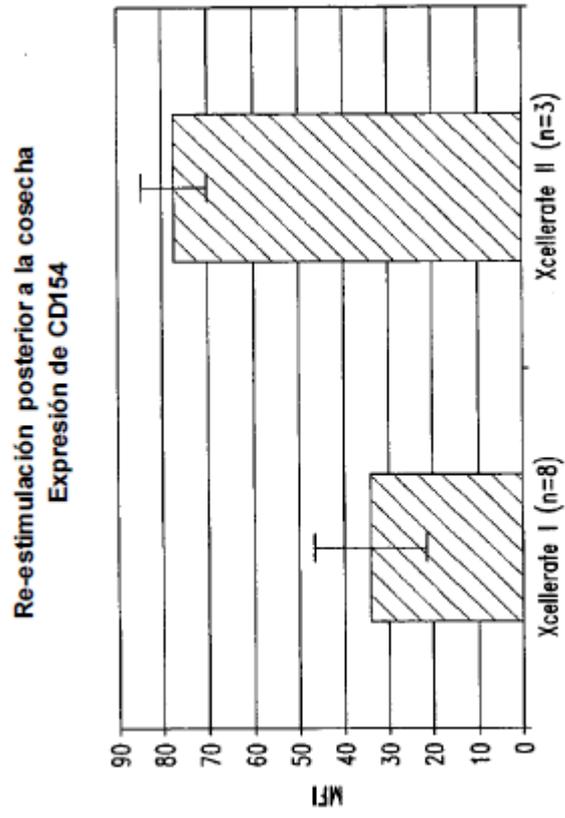
16. El método de la reivindicación 15, en donde dicha citocina se selecciona del grupo que consiste de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$ , y TNF- $\alpha$ .
- 5 17. El método de la reivindicación 15, en donde dicho agente reductor se selecciona del grupo que consiste de N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol.
18. El método de las reivindicaciones 1 a la 10, en donde dicha plataforma comprende además un elemento térmico variable y/o un imán.
- 10 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho sistema cerrado comprende además un distribuidor de gas y/o una bomba de jeringa y un control para la transferencia estéril hacia y desde dicho sistema cerrado.
- 15 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 19, en donde la superficie se selecciona a partir de metales, vidrio, plásticos, co-polímeros, coloides, lípidos, superficies celulares, o una partícula.
21. El método de la reivindicación 20, en donde dicha partícula es paramagnética.
22. El método de la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en donde dicha partícula es una perla.
- 20



*Fig. 1*



*Fig. 2*



*Fig. 3*

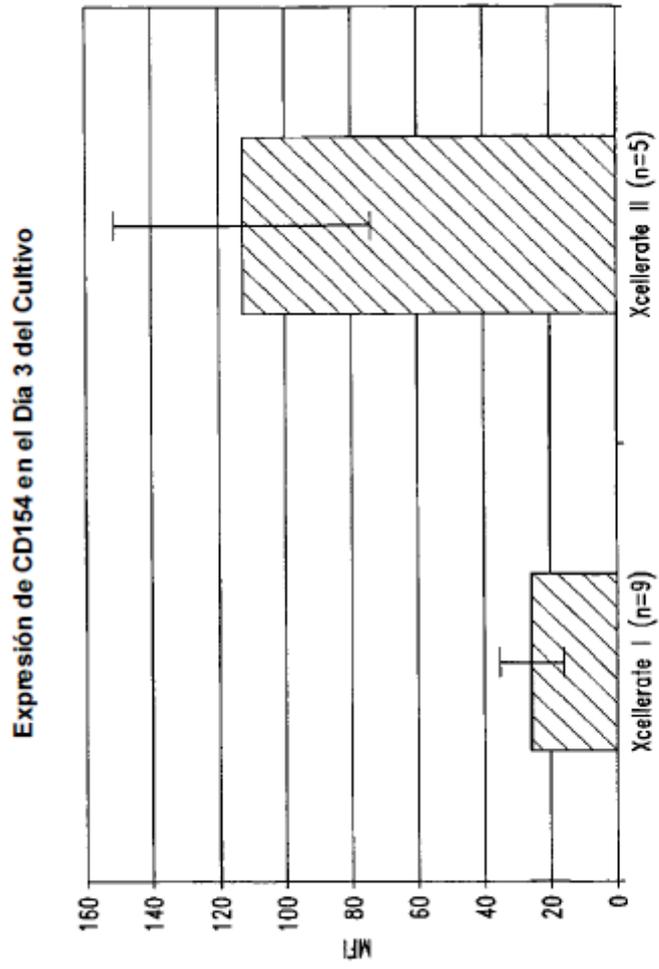
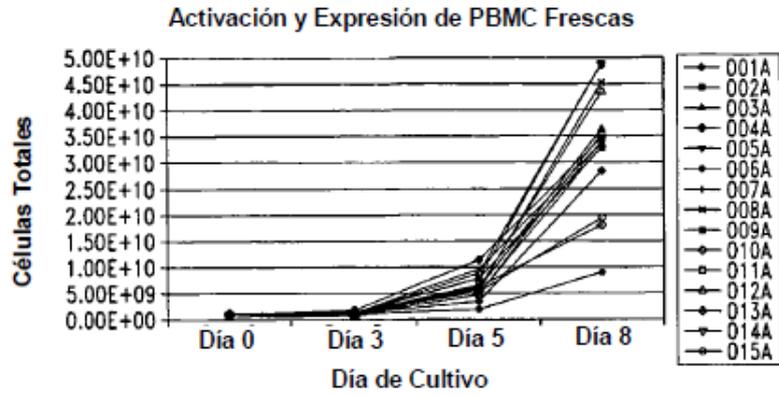
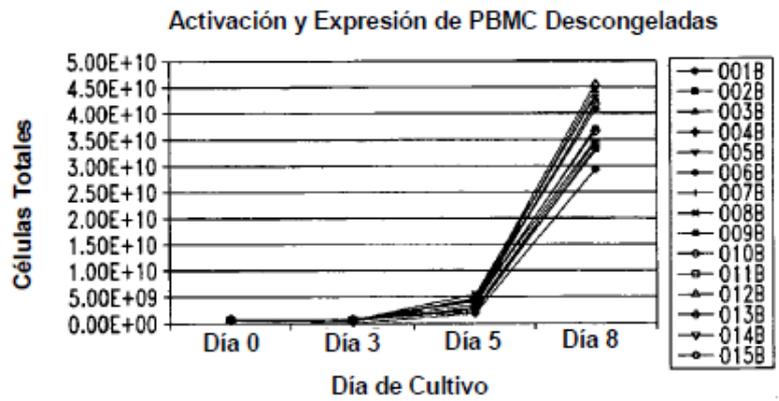


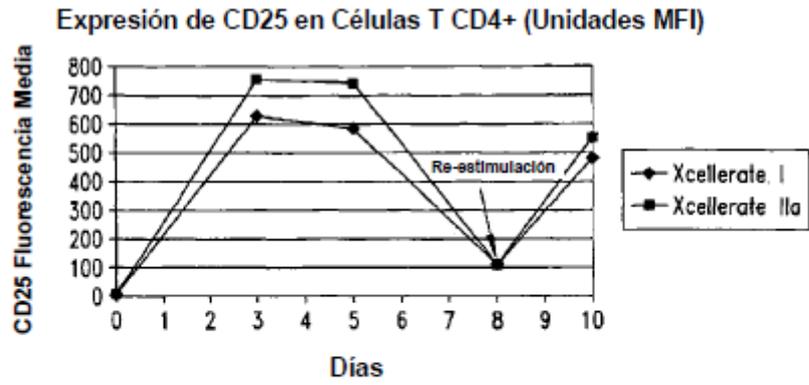
Fig. 4



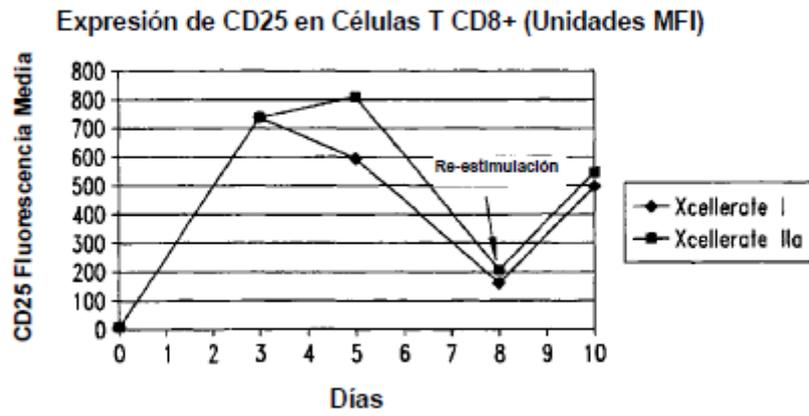
*Fig. 5A*



*Fig. 5B*



*Fig. 6A*



*Fig. 6B*

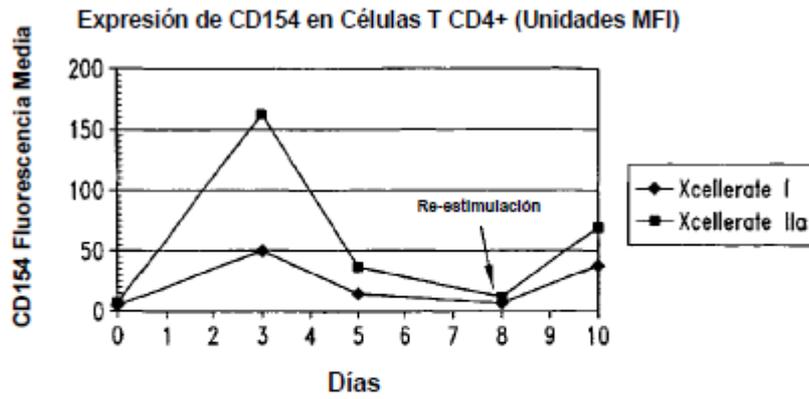


Fig. 7A

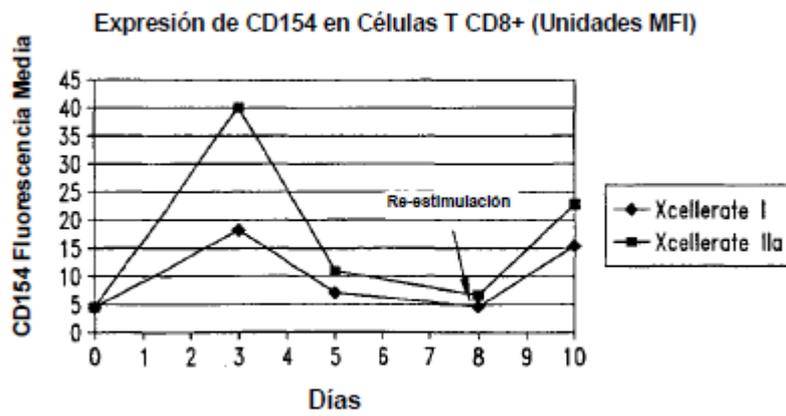
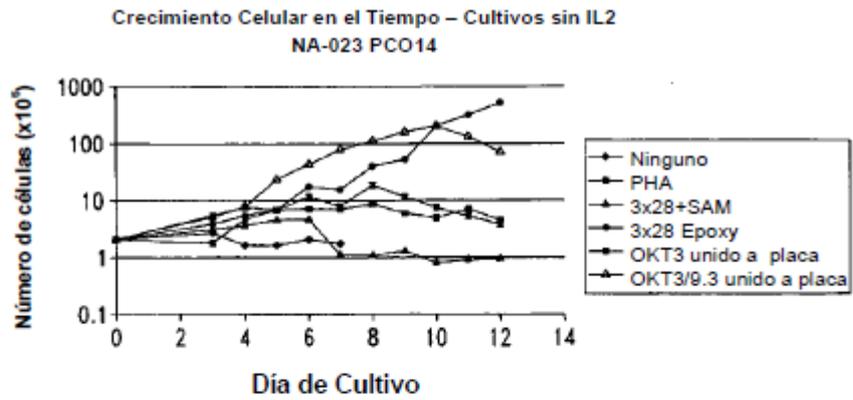
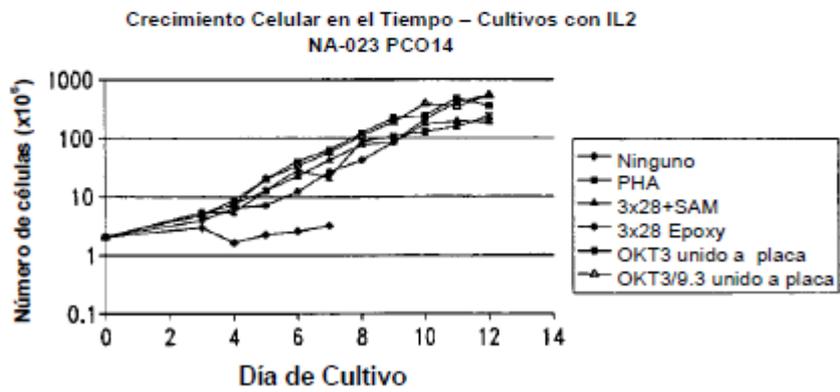


Fig. 7B



*Fig. 8A*



*Fig. 8B*

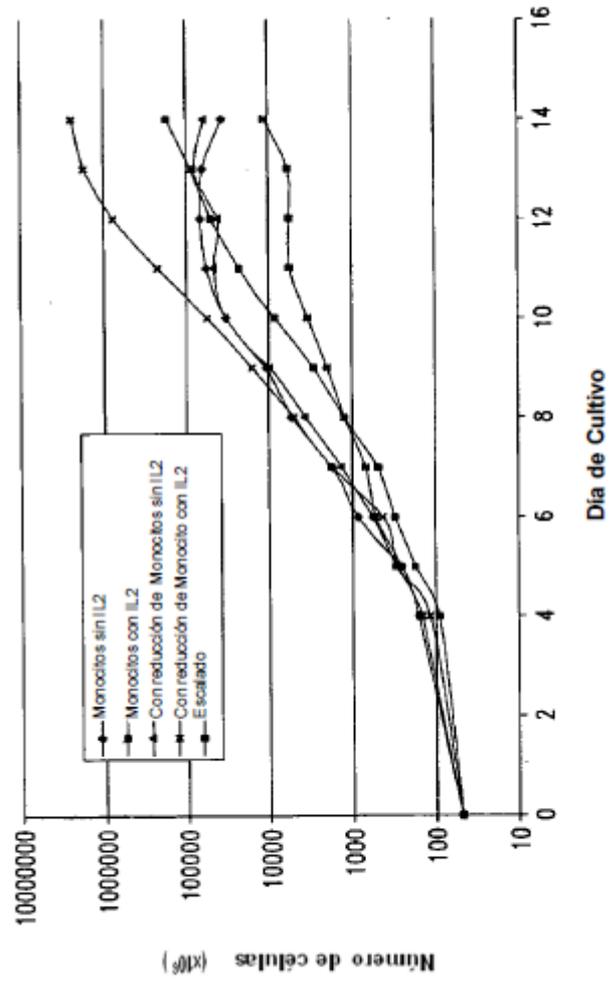


Fig. 9

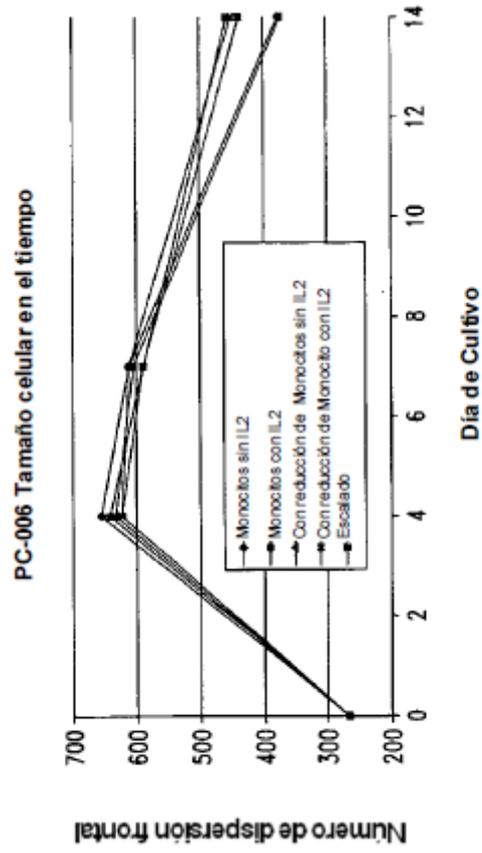


Fig. 10

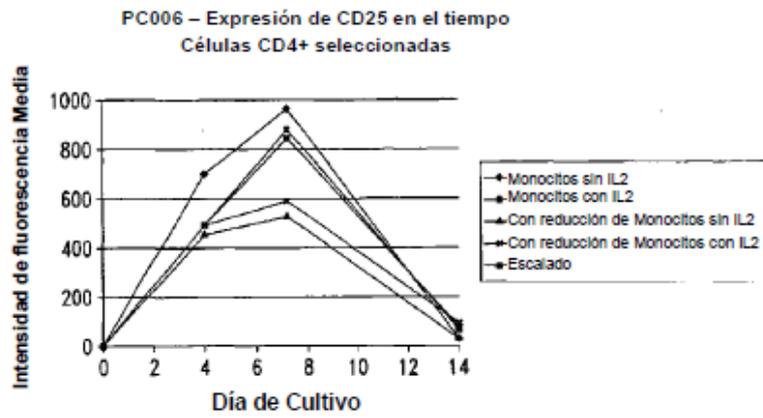


Fig. 11A

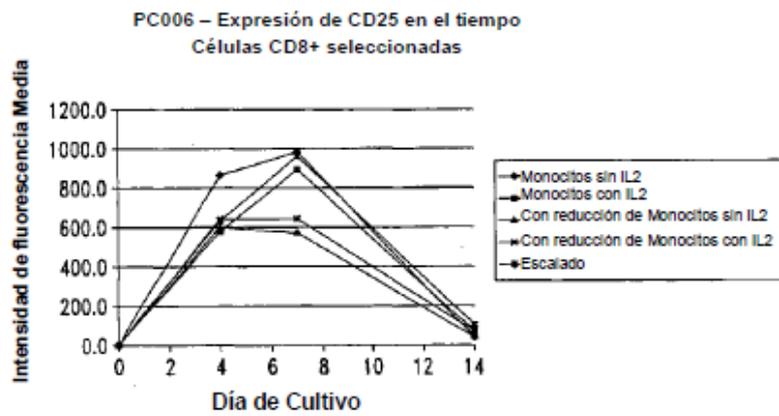


Fig. 11B

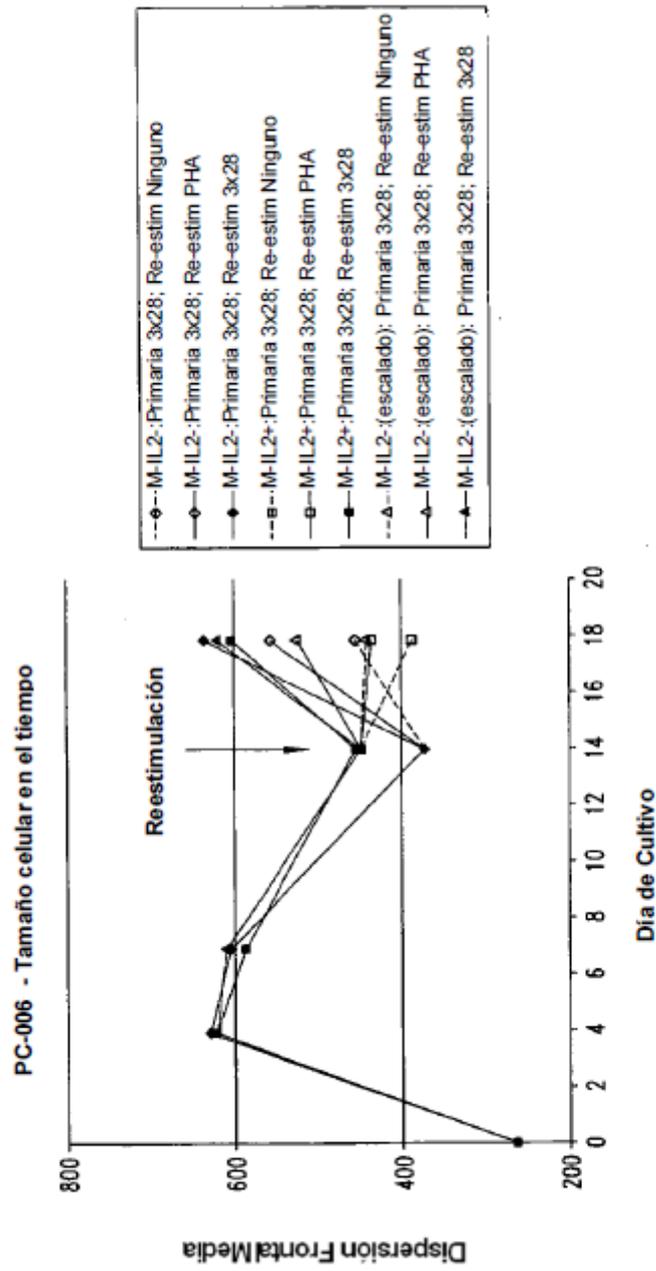


Fig. 12

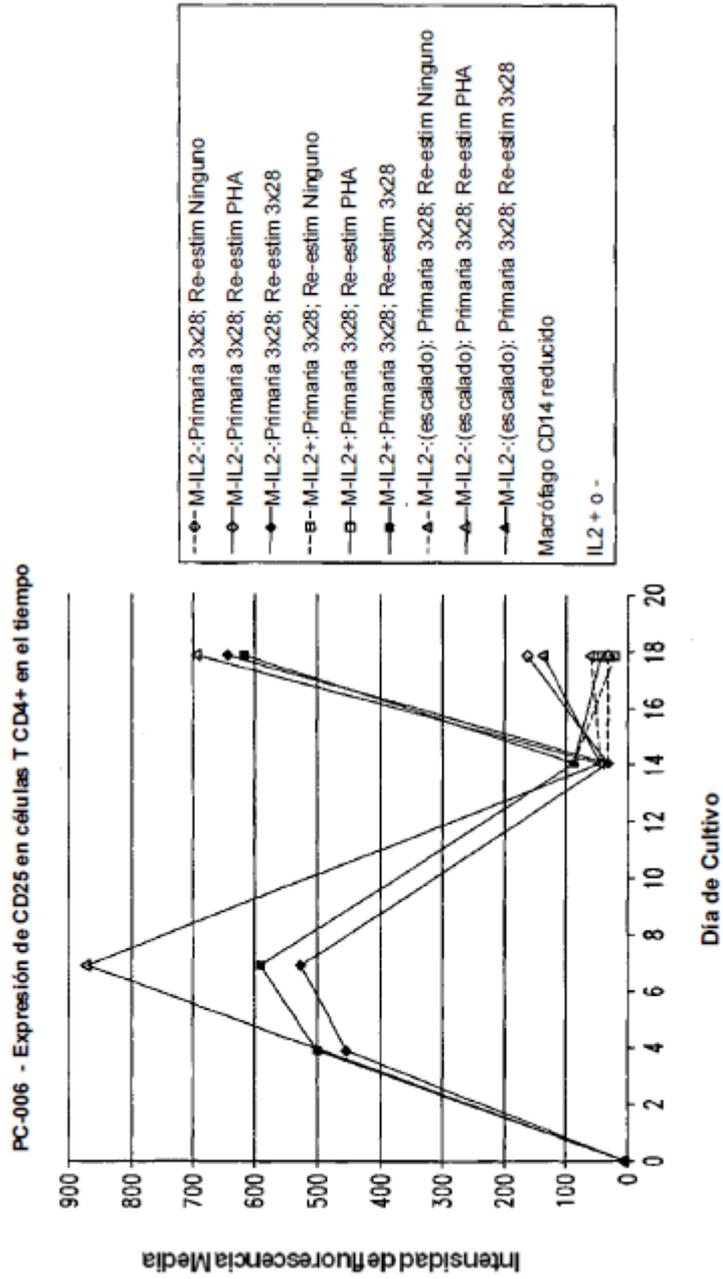


Fig. 13A

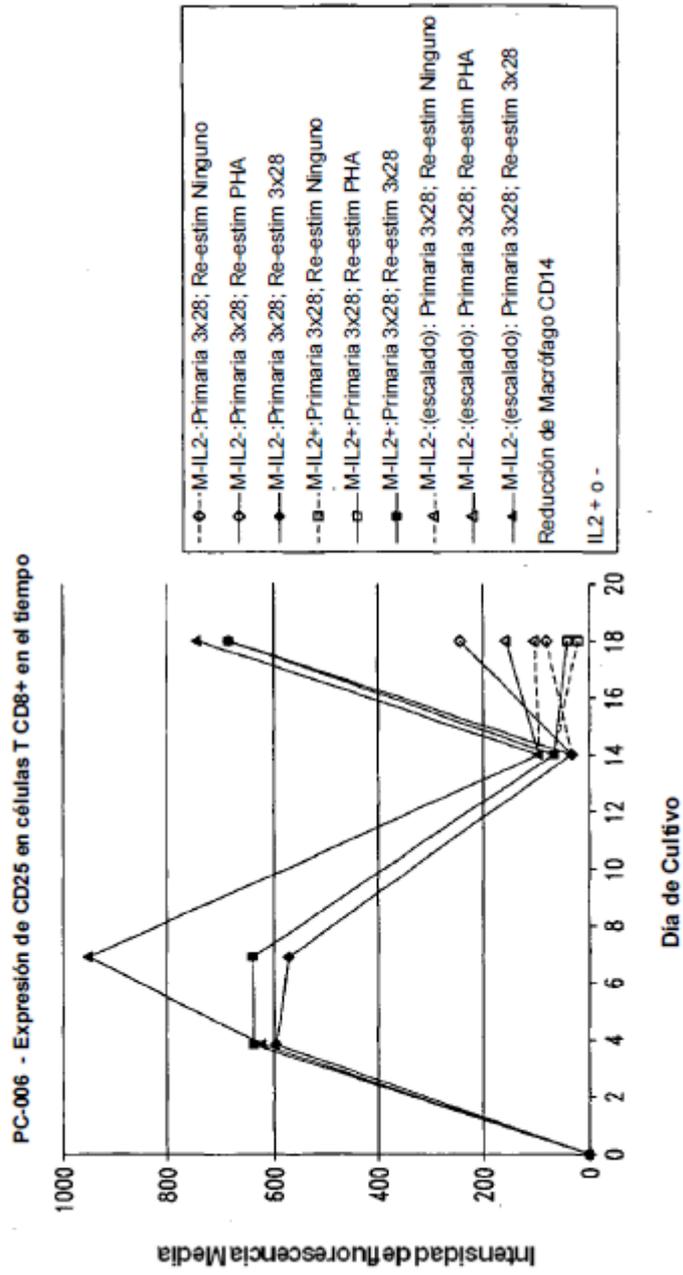
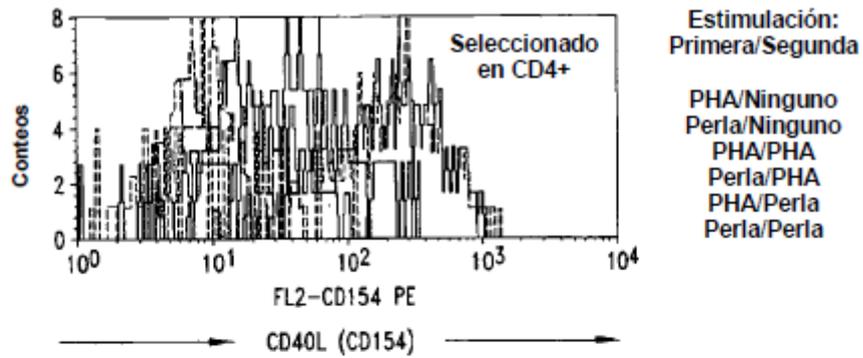
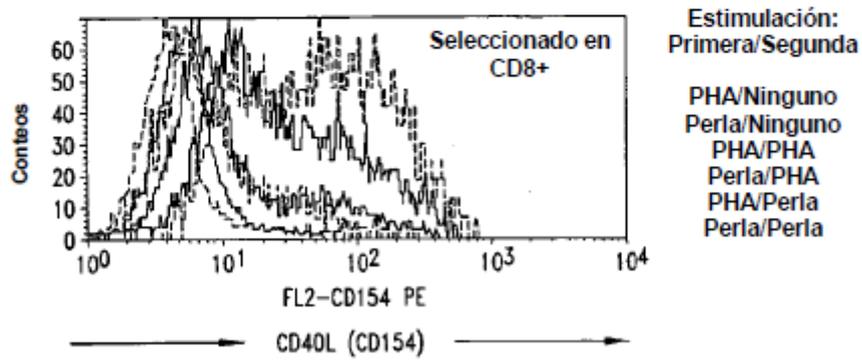


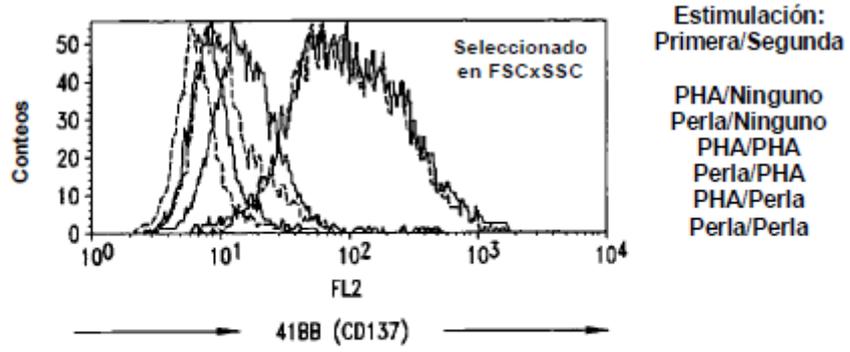
Fig. 13B



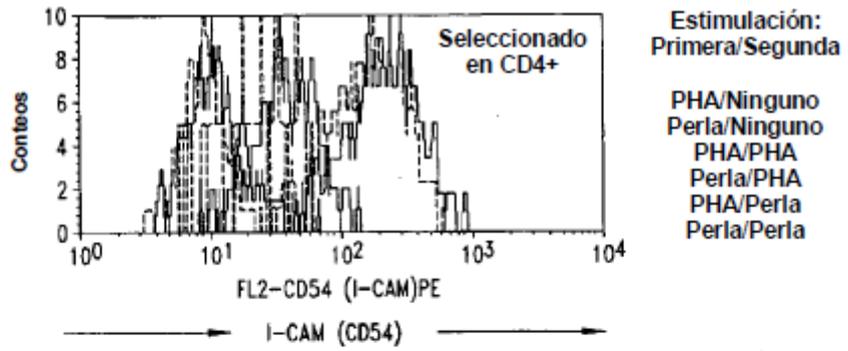
*Fig. 14A*



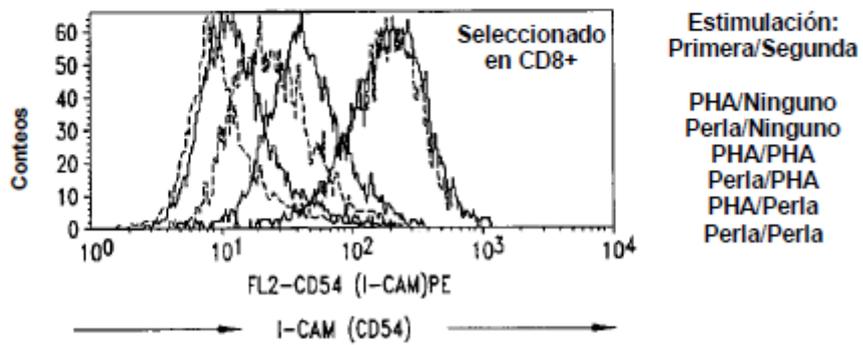
*Fig. 14B*



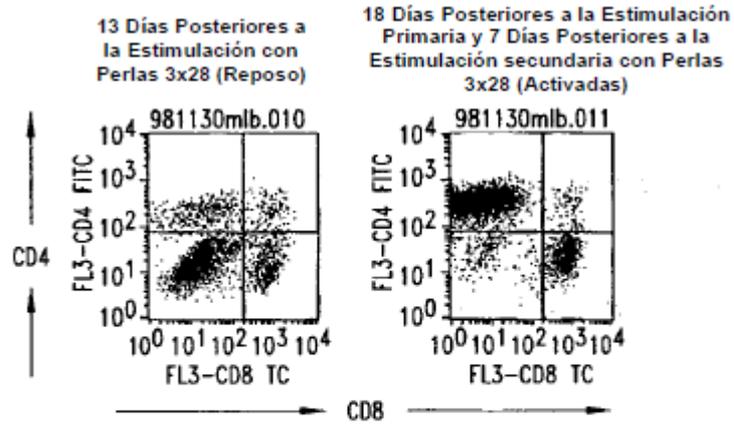
*Fig. 15*



*Fig. 16A*

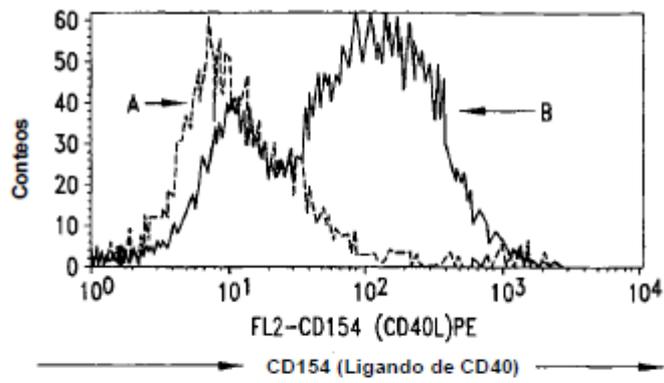


*Fig. 16B*

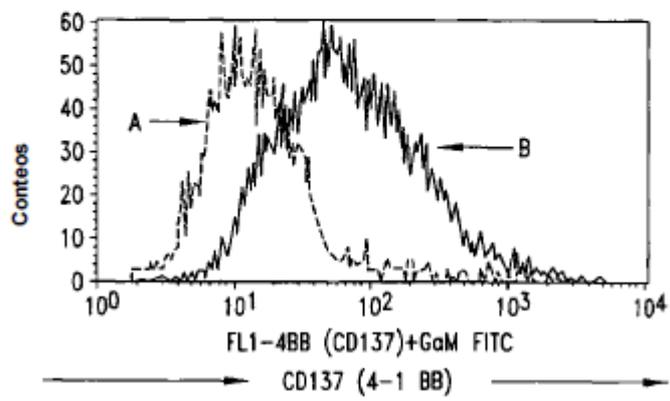


*Fig. 17A*

*Fig. 17B*



*Fig. 17C*



*Fig. 17D*

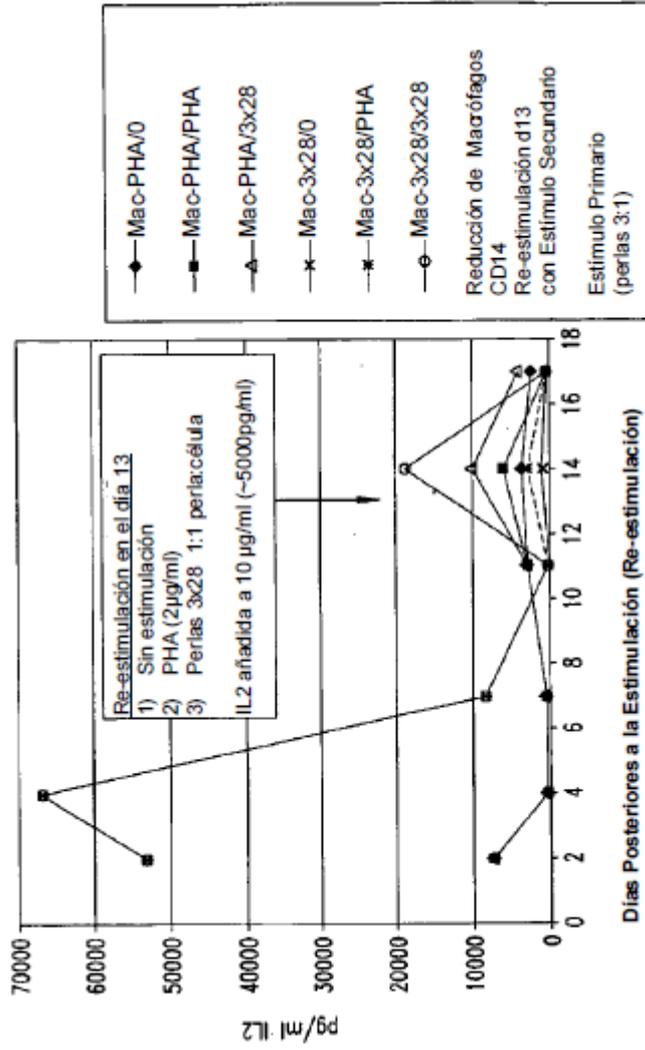


Fig. 18A

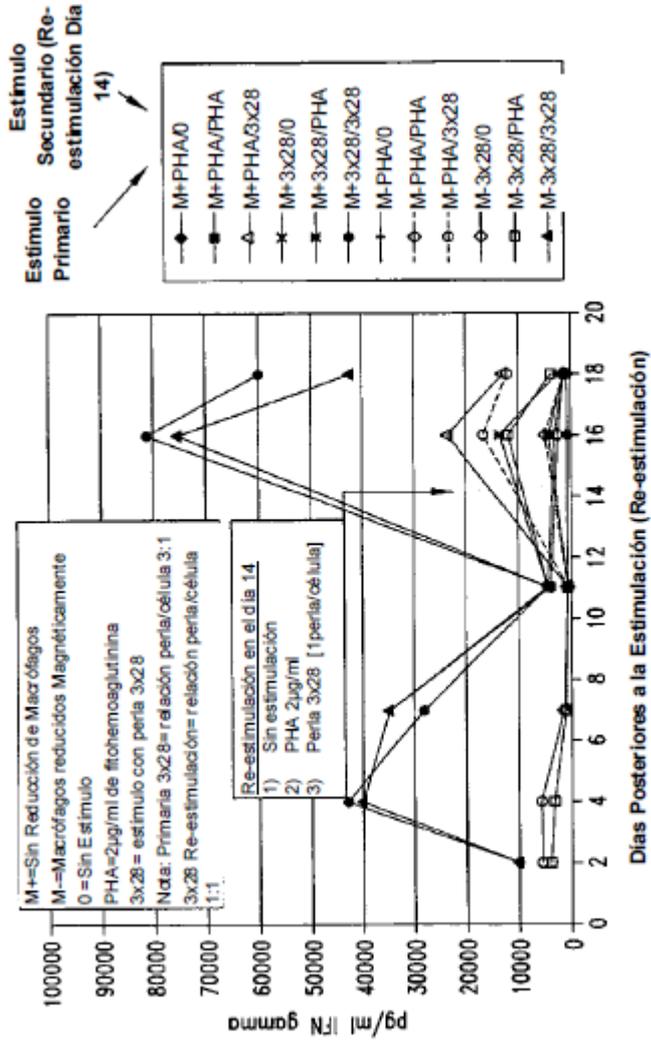


Fig. 18B

PC003: Cinética de IL4 Secretada Después de la Estimulación Primaria y la Re-estimulación

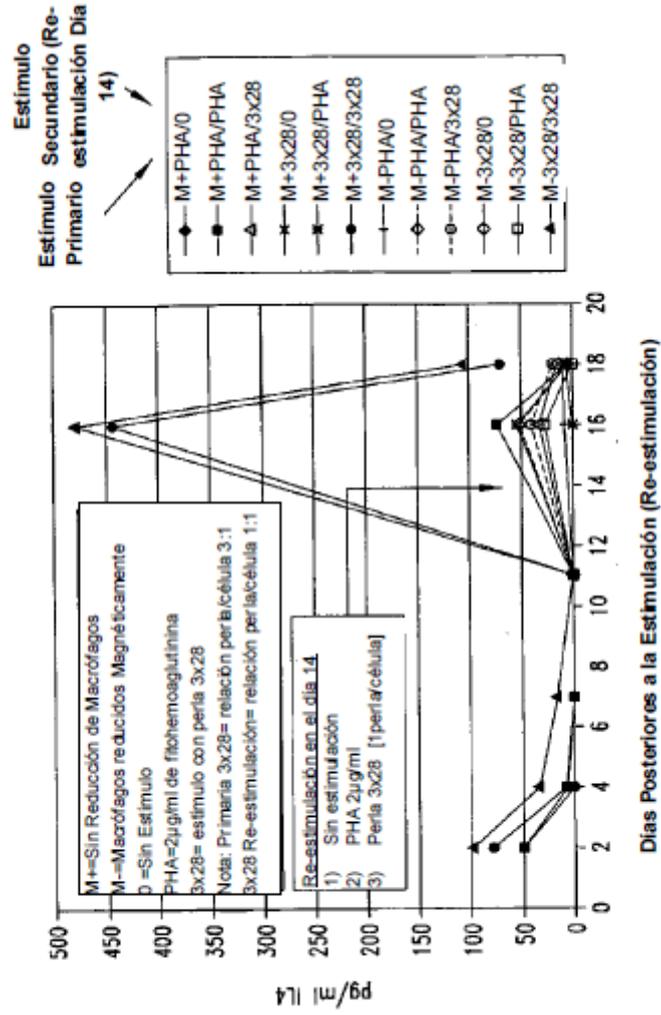


Fig. 18C

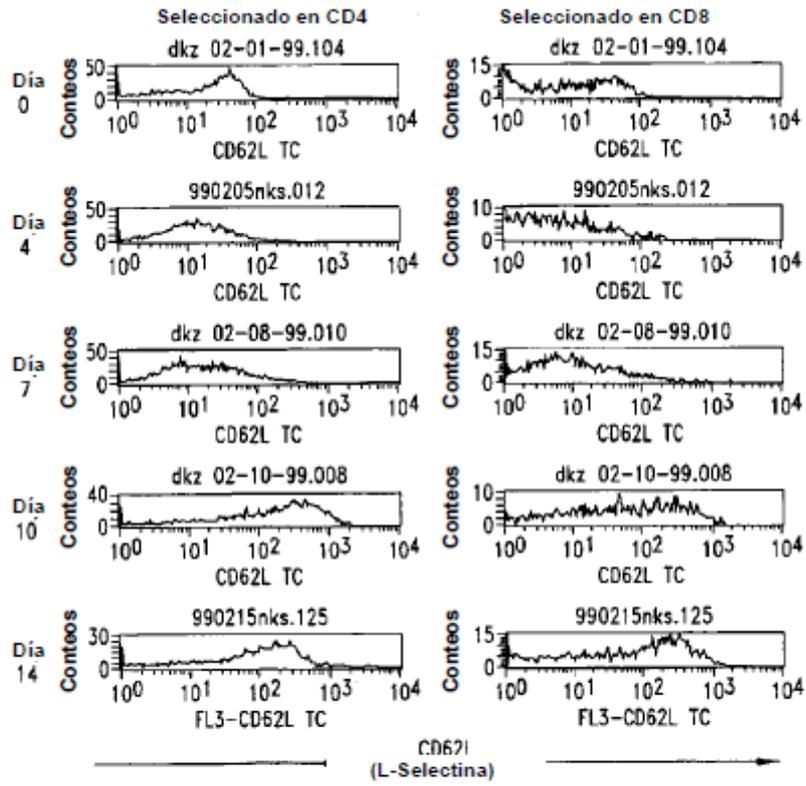
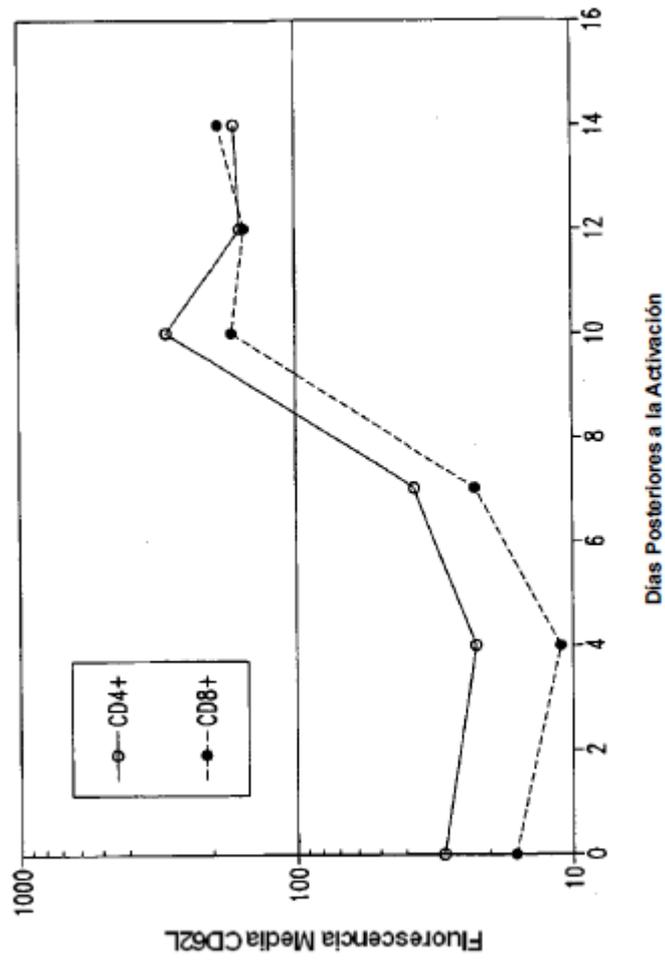


Fig. 19A



*Fig. 19B*

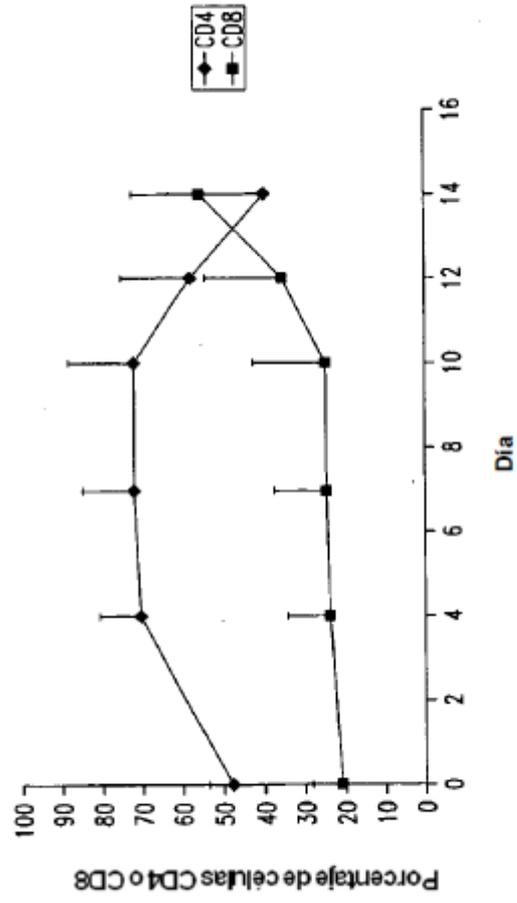


Fig. 20

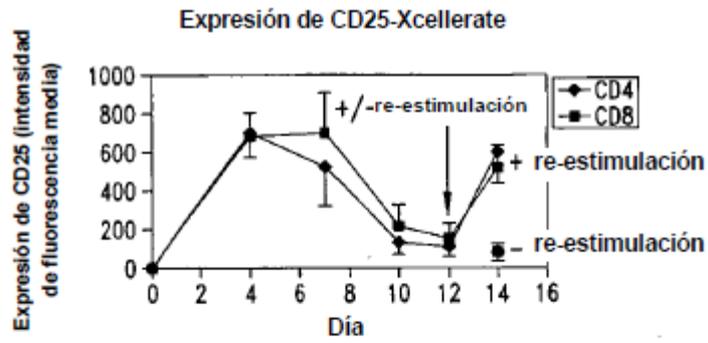


Fig. 21A

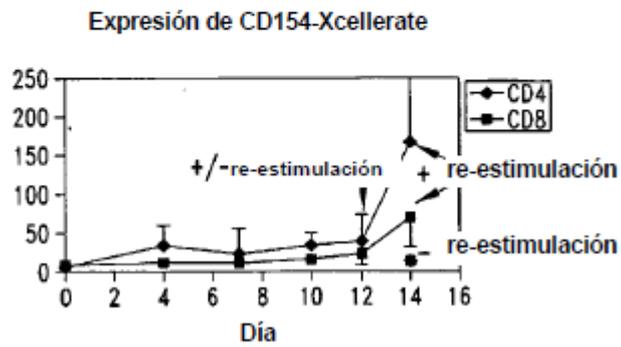
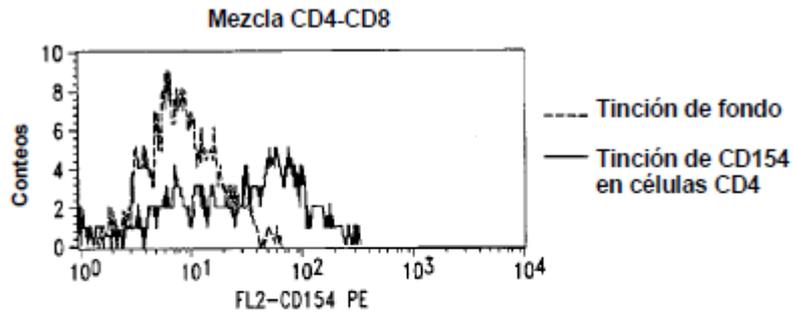
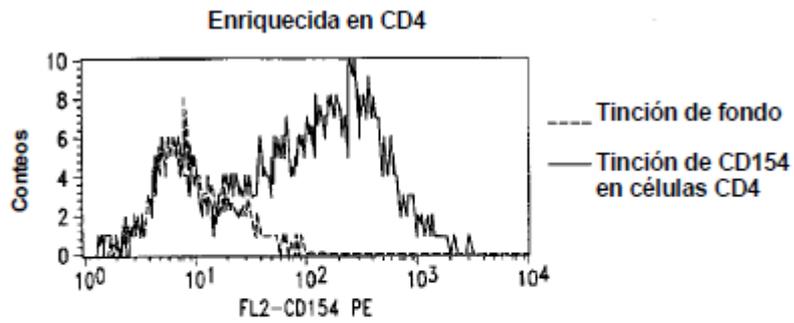


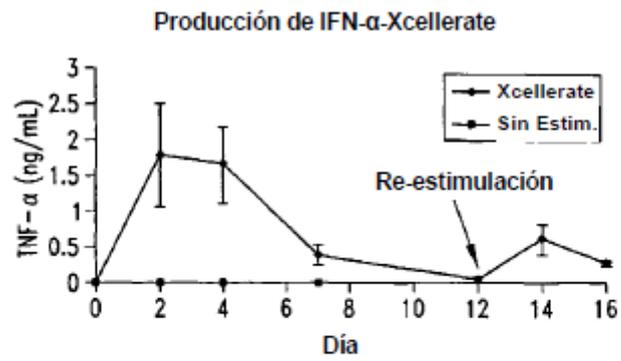
Fig. 21B



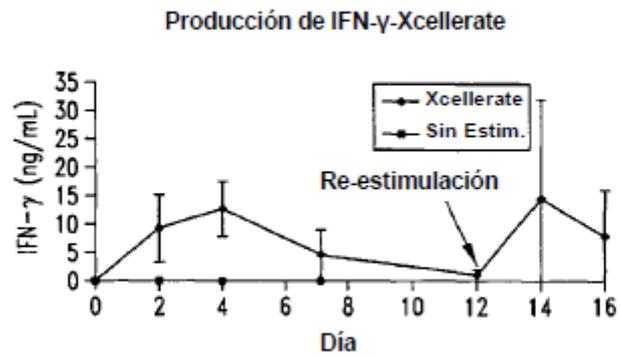
*Fig. 22A*



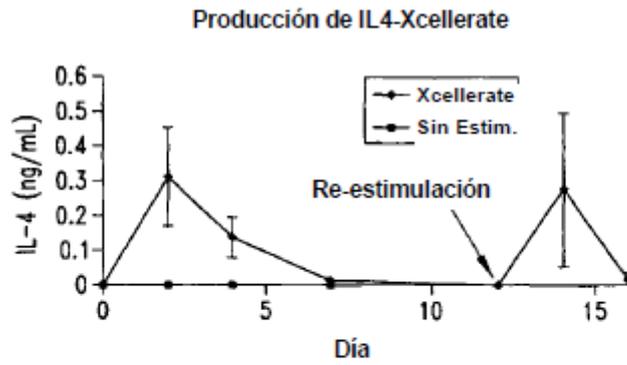
*Fig. 22B*



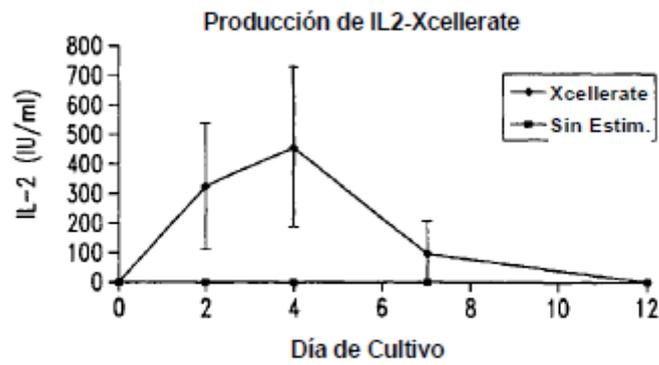
*Fig. 23A*



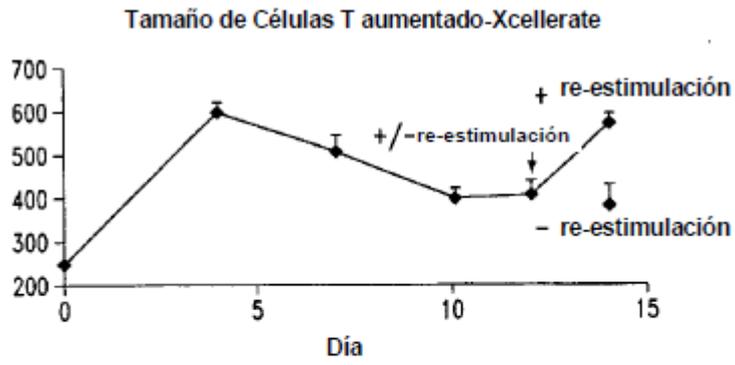
*Fig. 23B*



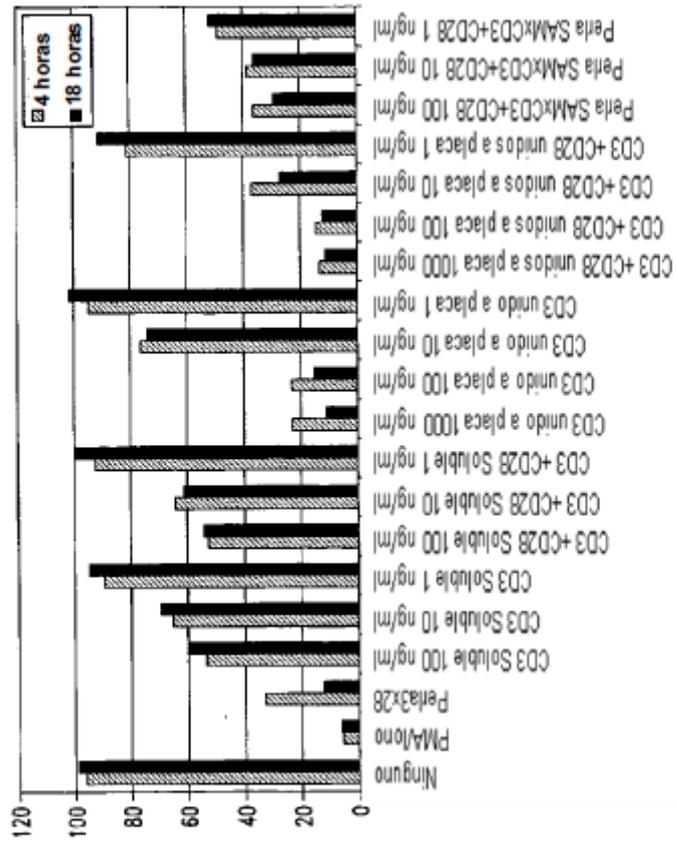
*Fig. 24A*



*Fig. 24B*

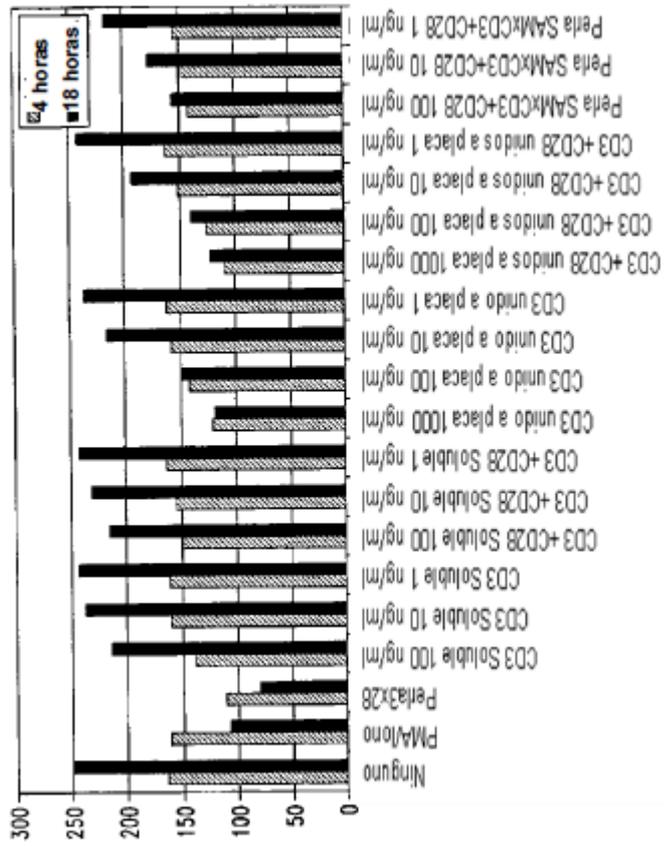


*Fig. 25*



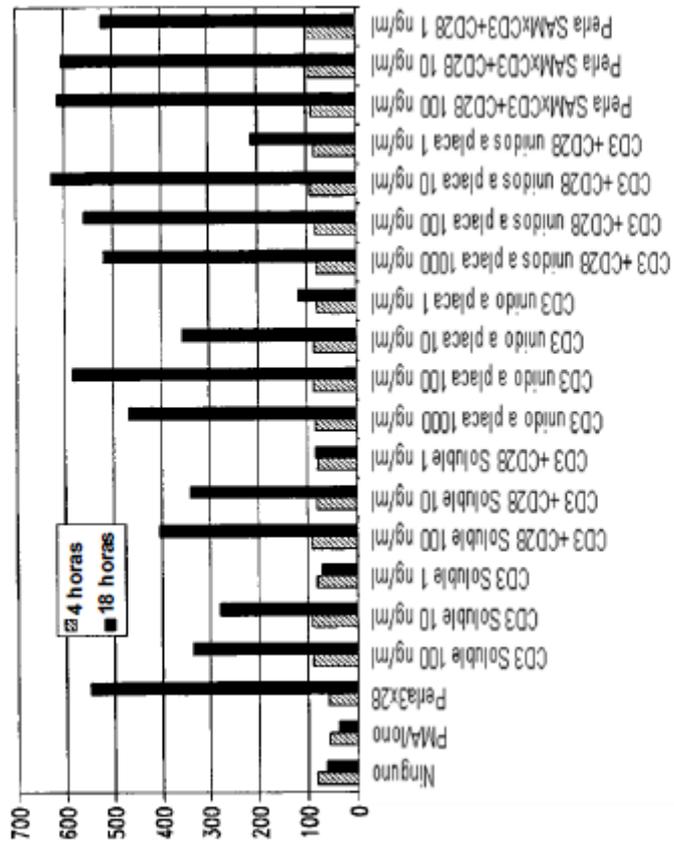
Re-estimulación de NDa055 (Día 8):  
Exposición de L-Selectina en Células T CD4+

*Fig. 26A*



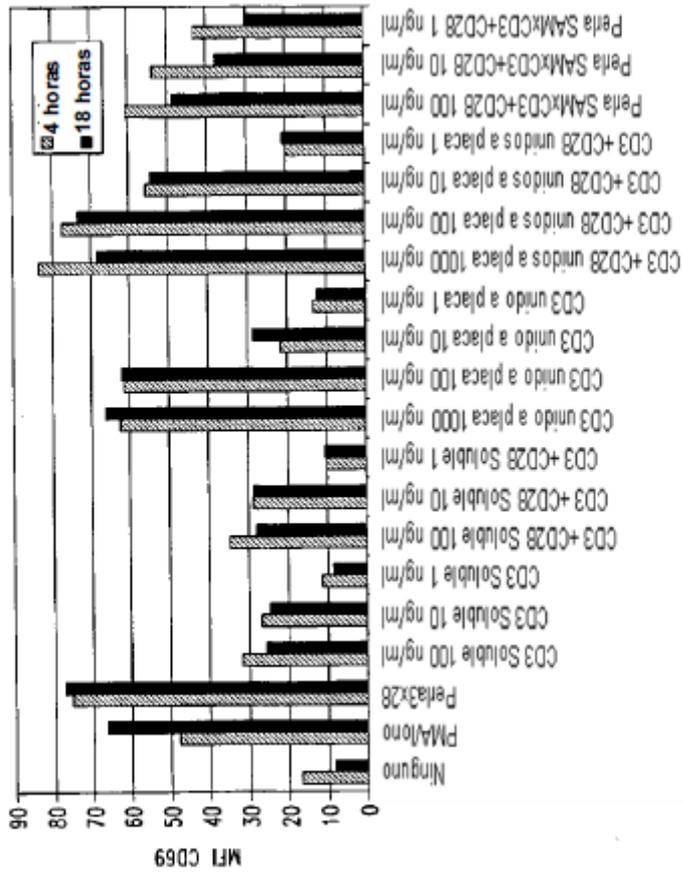
Re-estimulación de NDA055 (Día 8):  
 Expresión de CD49d (VLA4) en Células T CD4+

Fig. 26B



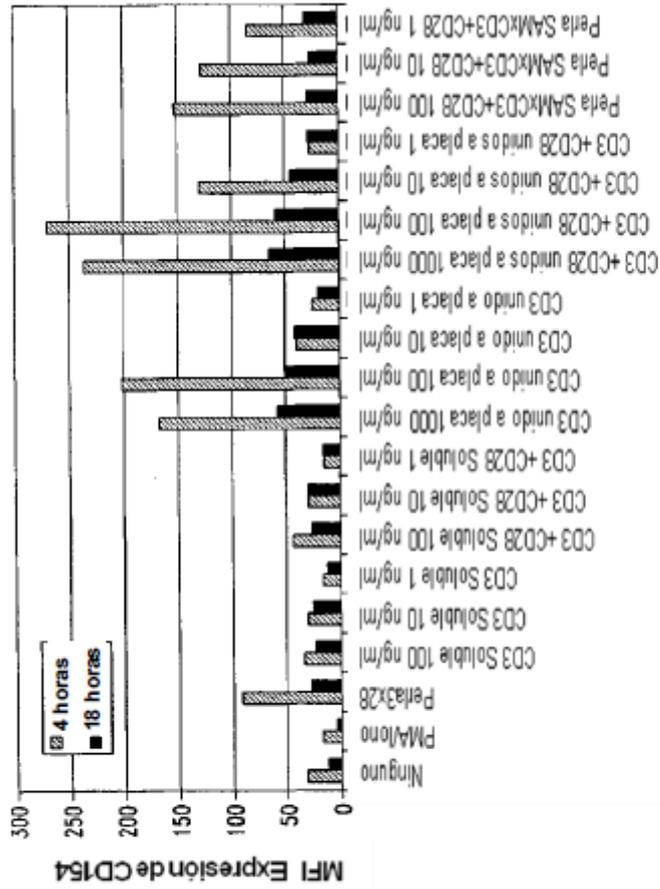
Re-estimulación de NDα055 (Día 8):  
 Expresión de CD25 (IL2-R) en Células T CD4+

*Fig. 26C*



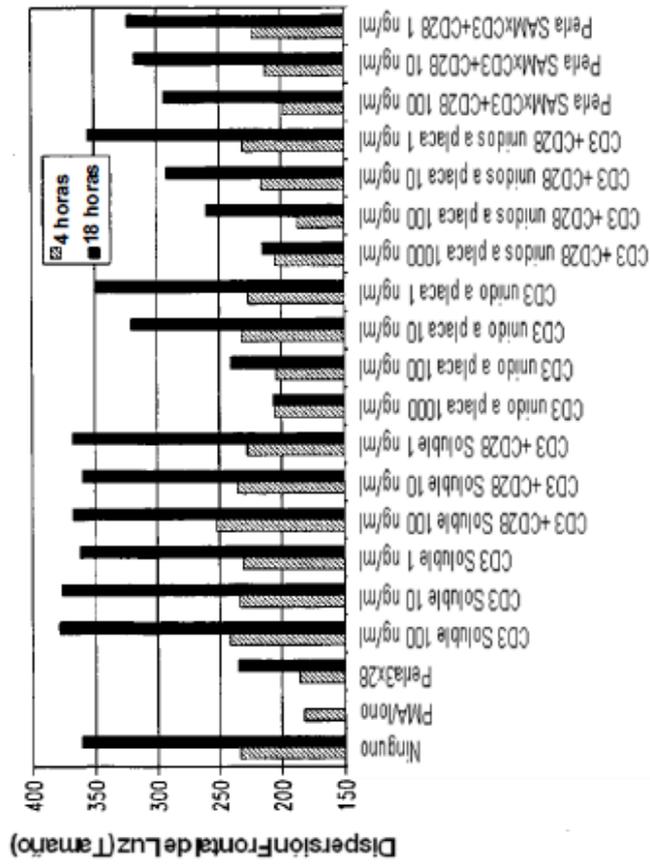
Re-estimulación de NDa055 (Día 8):  
Expresión de CD69 en Células T CD4+

Fig. 26D



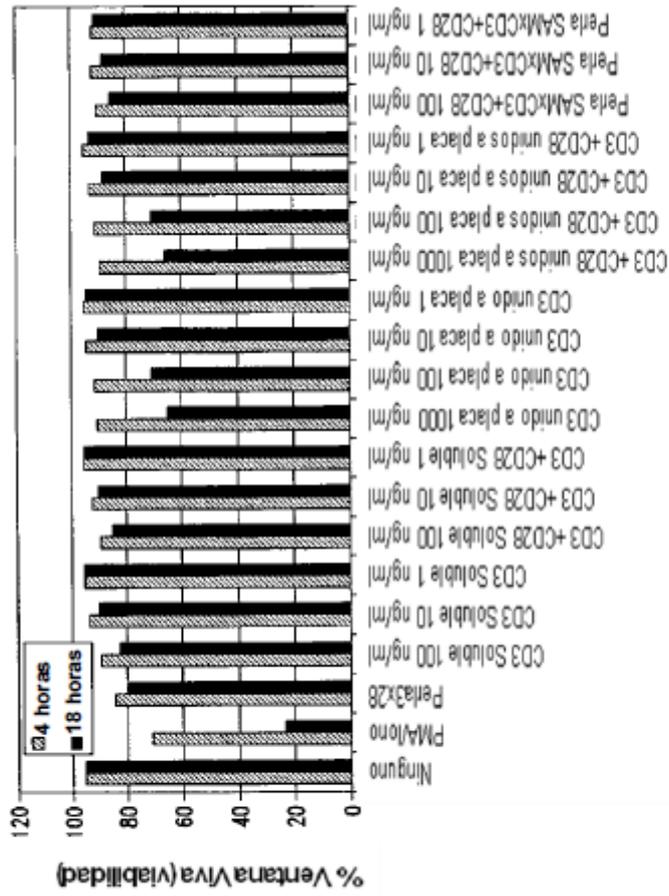
Re-estimulación de NDa055 (Día 8):  
 Expresión de CD154 (CD40L) en Células T CD4+

*Fig. 26E*



Re-estimulación de ND:055 (Día 8):  
Dispersión Frontal de Luz (Tamaño)

*Fig. 26F*



Re-estimulación de NDa055 (Día 8):  
Ventana Viva (viabilidad)

Fig. 26G

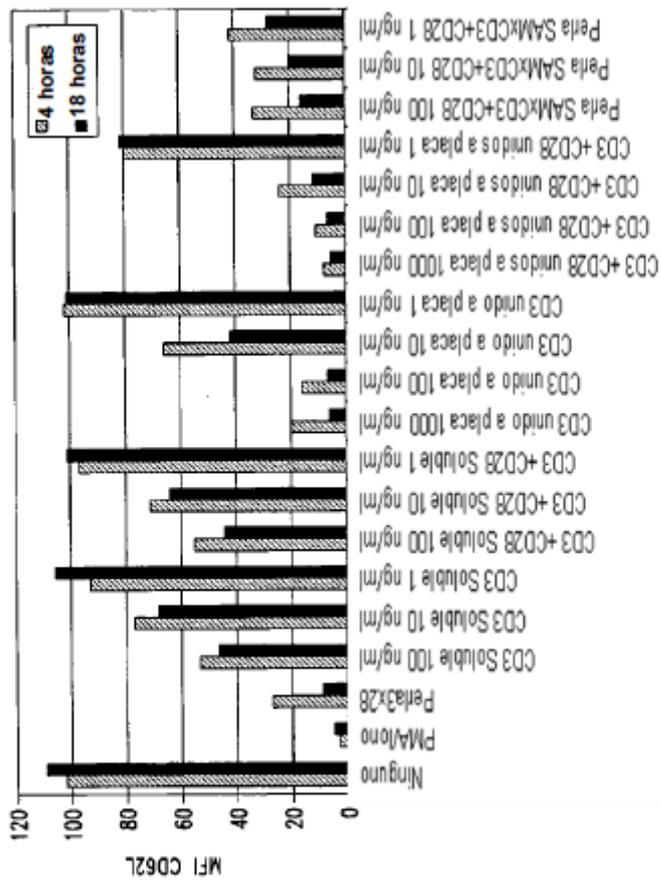


Fig. 26H

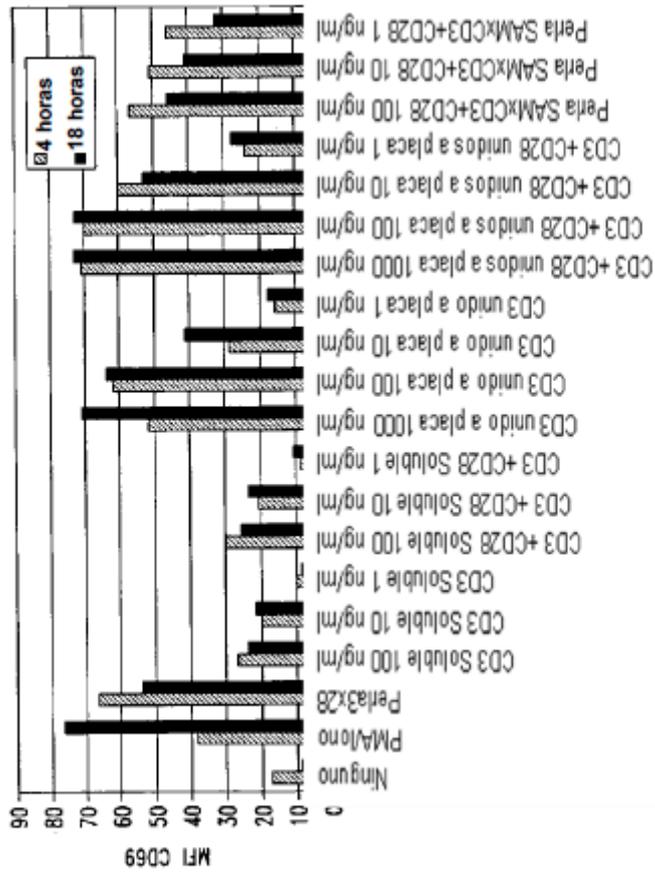


Fig. 26I

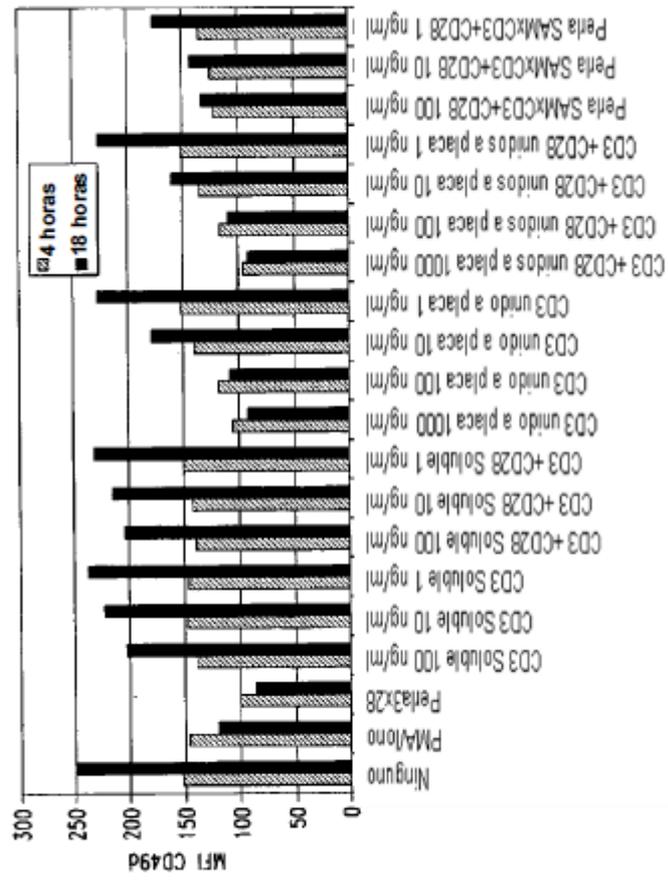


Fig. 26J

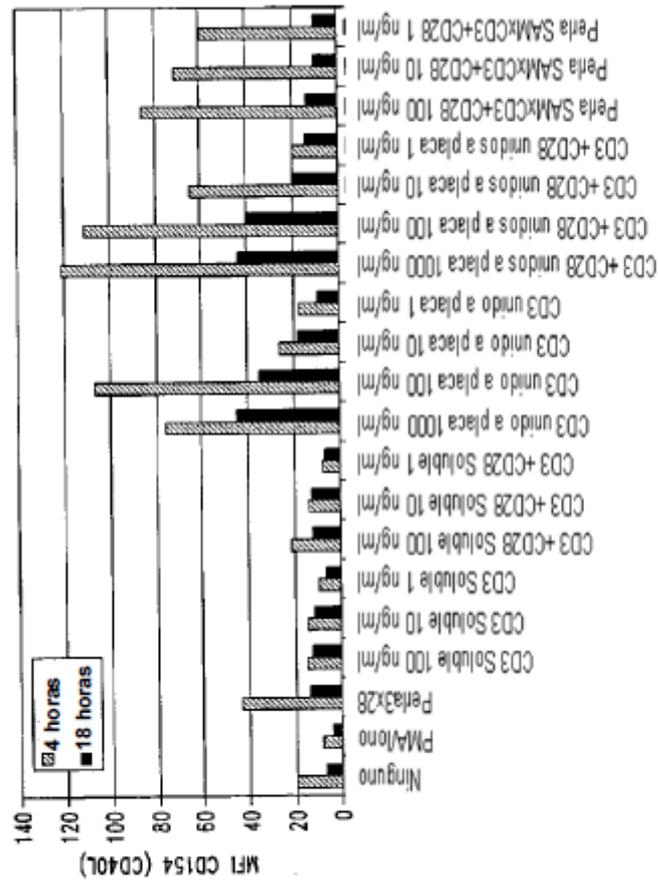


Fig. 26K

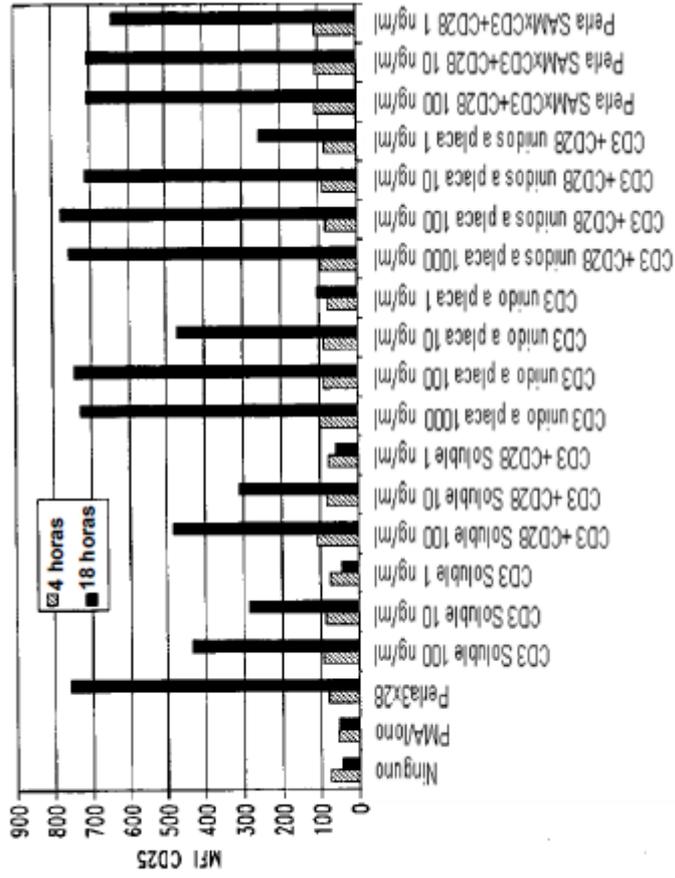
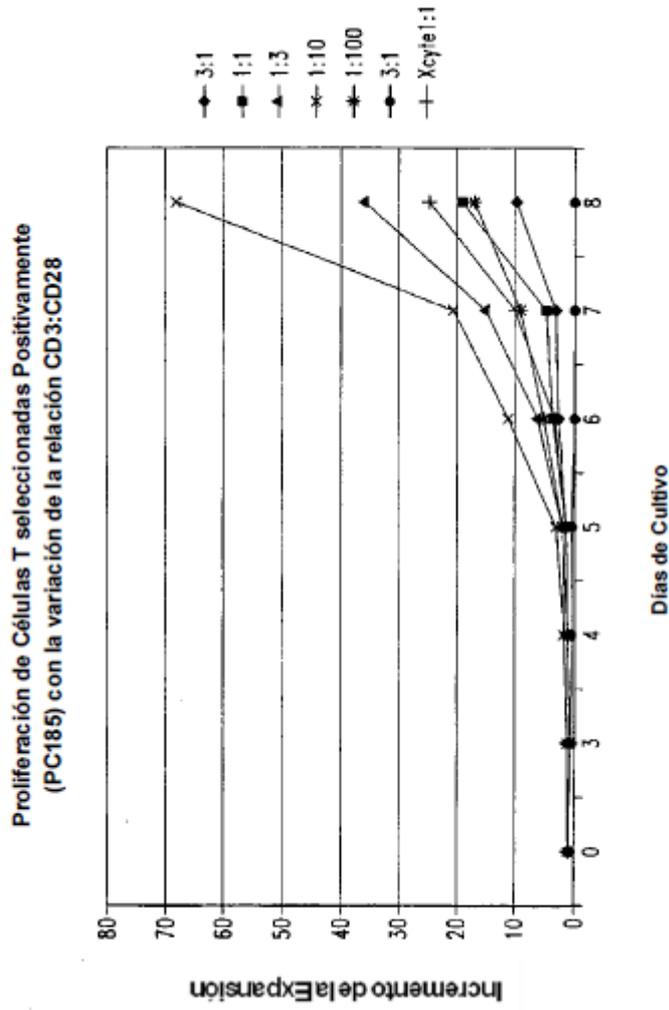
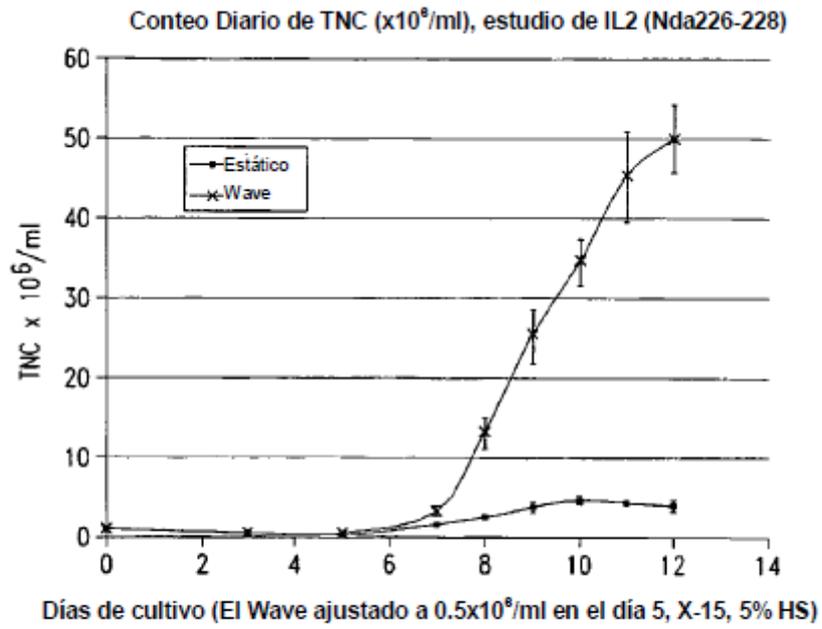


Fig. 26L



*Fig. 27*



*Fig. 28*