

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 452**

21 Número de solicitud: 201231848

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**28.11.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**01.07.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070826**

71 Solicitantes:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (100.0%)  
Avda de la Constitucion 18  
41071 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**PÉREZ SIMÓN , José Antonio y  
SÁNCHEZ-ABARCA BERNAL, Luis Ignacio**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **Procedimiento para la selección de linfocitos T antígeno-específicos mediante la identificación de dobletes.**

57 Resumen:

Procedimiento lo selección de linfocitos T antígeno-específicos mediante la identificación de dobletes. La presente invención se refiere al campo médico, particularmente a un procedimiento para la selección de linfocitos T antígeno-específicos para su uso en terapia. Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados para su uso en terapia.

**ES 2 472 452 A1**

**DESCRIPCIÓN****Procedimiento para la selección de linfocitos T antígeno-específicos mediante la identificación de dobletes.****5 Campo de la técnica**

La presente invención se refiere al campo médico, particularmente a un procedimiento para la selección de linfocitos T antígeno-específicos para uso en terapia, más concretamente para su uso en trasplantes.

10

**Antecedentes de la invención**

15 Los trabajos de investigación llevados a cabo por los autores de la presente invención han permitido desarrollar un nuevo procedimiento de profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) basado en la utilización de inhibidores de proteosomas, como el bortezomib (WO2007/090912). Estos fármacos actúan bloqueando la degradación de I-kB lo que, finalmente, impide la transcripción al núcleo de NF-kB, factor de transcripción clave en la activación linfocitaria. Mediante este procedimiento se ha demostrado que puede generarse, 20 tras cultivo *in vitro* de linfocitos del donante y células mononucleadas del receptor, una apoptosis y depleción selectiva de linfocitos T (LT) alorreactivos, responsables de la enfermedad injerto contra huésped, manteniendo la viabilidad de poblaciones de LT con actividad reguladora / supresora. De esta forma, la depleción de LT aloreactivos empleando bortezomib *in vitro* permite eliminar específicamente aquellos linfocitos que se activan en el cultivo mixto preservando el resto de poblaciones linfocitarias. En este sentido, en ausencia de péptido pp65 de CMV en el cultivo mixto se ha comprobado cómo, en un cultivo secundario, los LT alodepleccionados mantienen la reactividad frente a CMV mientras que se pierde la reactividad frente a las células estimuladoras presentes en un cultivo primario y al contrario, cómo la presencia de pp65 /CMV en el cultivo primario elimina la respuesta anti- 25 CMV en el cultivo secundario. Estos hallazgos han sido la base para el desarrollo de diversos ensayos clínicos en los que se ha confirmado cómo el uso de bortezomib peritrasplante disminuye el riesgo de EICH incluso en pacientes sometidos a trasplante de donante no emparentado.

35 Sin embargo, precisamente en el efecto citotóxico de los linfocitos T (LT) del donante sobre órganos vitales del paciente causado por la enfermedad injerto contra huésped, reside también el efecto curativo del trasplante alogénico, ya que los linfocitos del donante desencadenan una respuesta inmune frente al tejido hematopoyético y las células tumorales del paciente, provocando el efecto injerto contra leucemia (EICL). De hecho en la actualidad aún no se ha 40 podido desarrollar ningún procedimiento que permita separar el EICL de la EICH de manera que, en la práctica, los procedimientos más eficaces en la prevención de la EICH, como la depleción de LT del donante, provocan también una inmunosupresión más profunda y, por tanto, un mayor riesgo de recaída (menor EICL) o de infecciones potencialmente fatales en el periodo postrasplante.

45

Por lo tanto, la presente invención se enfrenta, entre otros, al problema de eliminar los linfocitos aloreactivos manteniendo una respuesta citotóxica adecuada frente a las células tumorales.

**50 Breve descripción de la invención**

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento (de aquí en adelante “procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención”) para la selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. generar un cultivo mixto in vitro que comprenda linfocitos T (células efectoras) del donante y células del receptor, exponiendo dicho cultivo a un inhibidor del NF-kB para generar la alodeplección selectiva de los linfocitos T alorreactivos;
- 10 b. generar un segundo cultivo mixto in vitro que comprenda los linfocitos T (células efectoras) una vez han sido alodepleccionados del paso a) y células que presenten al menos un antígeno de interés (células diana) del receptor;
- 15 c. seleccionar células que estén formando uniones estables (dobletes), identificándose éstas por su positividad para un antígeno T específico y para un marcador específico o no de las células diana;
- d. separar las células efectoras de las células diana que forman los dobletes seleccionados en el paso c); y
- e. opcionalmente aislar las células efectoras de las células diana.

20 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, las células diana del paso a) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención, se seleccionan de la lista que consiste en células mononucleadas o células dendríticas. Adicionalmente, las células diana del receptor del paso b) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención, se seleccionan de la lista que consiste en células mononucleadas, células tumorales y células dendríticas.

25 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención el cultivo mixto del paso b) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención, se mantiene por un período entre 3 y 24 horas, preferentemente entre 10 y 17,5 horas, más preferentemente el cultivo mixto se mantiene por un periodo de 15 horas.

30 En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la selección de los dobletes del paso c) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención se realiza por citometría de flujo o “cell sorting”. Preferentemente los dobletes se identifican por su positividad para el antígeno de superficie T específico CD3 y para el marcador de las células diana PKH-67.

35 En otra realización preferida de la invención, la separación de las células efectoras de las células diana del paso d) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos de la invención se realiza incubando los dobletes del paso b) en placas de cultivo en presencia de medio RPMI con 10% de SAB durante un periodo de 10 a 15 horas.

40 En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el inhibidor del NF-kB del paso a) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención es bortezomib.

45 Adicionalmente, se hace notar que la alodeplección del producto, paso a), se puede realizar previa o posteriormente a la selección de los linfocitos T antígeno-específicos. Preferentemente dicha alodeplección se realiza previamente a la selección de los linfocitos.

50 Se hace notar que cualquiera de las realizaciones preferidas del primer aspecto de la invención pueden combinarse entre sí.

Por otro lado, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento (de aquí en adelante “procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos de la invención”) para la selección de linfocitos T antígeno-específicos que comprende las siguientes etapas:

- a. generar un cultivo mixto in vitro que comprenda linfocitos T (células efectoras) y células que presenten al menos un antígeno de interés (células diana);
- b. seleccionar células que estén formando uniones estables (dobletes), identificándose éstas por su positividad para un antígeno T específico y para un marcador específico o no de las células diana;
- c. separar las células efectoras de las células diana que forman los dobletes seleccionados en el paso b); y
- d. opcionalmente aislar la células efectoras de las células diana.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención el cultivo mixto del paso a) se mantiene por un periodo entre 3 y 24 horas, preferentemente entre 10 y 17,5 horas, más preferentemente el cultivo mixto se mantiene por un período de 15 horas.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, la selección de los dobletes del paso b) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos de la invención se realiza por citometría de flujo o “cell sorting”. Preferentemente los dobletes se identifican por su positividad para el antígeno de superficie T específico CD3 y para el marcador de las células diana PKH-67. No obstante, cualquier otro marcador específico de la célula diana normal, presentadora de antígenos – por ejemplo derivados de patógenos- o tumoral serviría para poner en práctica la presente invención.

En aún otra realización preferida de la invención, la separación de las células efectoras de las células diana del paso c) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos de la invención se realiza incubando los dobletes del paso b) en placas de cultivo en presencia de medio RPMI con 10% de SAB durante un periodo de 10 a 15 horas.

Se hace notar que cualquiera de las realizaciones preferidas del segundo aspecto de la invención pueden combinarse entre sí.

Por otro lado, un tercer aspecto de la invención, se refiere a los linfocitos T obtenibles de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención así como por cualquiera de sus realizaciones preferidas. Asimismo, una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende los linfocitos T obtenibles de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención así como por cualquiera de sus realizaciones preferidas. Preferentemente dicha composición es una composición farmacéutica que opcionalmente además comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a los linfocitos T obtenibles de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención así como por cualquiera de sus realizaciones preferidas, para su uso en terapia. En una realización particular del cuarto aspecto de la invención los Linfocitos T así obtenidos se usan para la realización de trasplantes. Alternativamente, los Linfocitos T así obtenidos se utilizan para la elaboración de un medicamento para su uso en trasplantes. Preferentemente para su uso en el trasplante hematopoyético.

**Breve descripción de las figuras**

5 **Figura 1.** Linfocitos T de donante (CD3+) y células presentadoras de antígeno (CD86+ y marcadas con PKH) de paciente tras co-cultivo de 5 horas. Se observa un 0,6% de eventos CD3+PKH+ viables

10 **Figura 2.** Linfocitos T de donante (CD3+) y células presentadoras de antígeno (CD86+ y marcadas con PKH) de paciente tras co-cultivo de 5 horas. En este caso las células presentadoras de antígenos (CPA) se han madurado previamente tras exposición a lipopolisacárido (LPS). Se observa un 2,4% de eventos CD3+PKH+ viables

15 **Figura 3.** Linfocitos T de donante (CD3+) y células presentadoras de antígeno (CD86+ y marcadas con PKH) de paciente tras co-cultivo de 7,5 horas. Se observa un 2% de eventos CD3+PKH+ viables

20 **Figura 4.** Linfocitos T de donante (CD3+) y células presentadoras de antígeno (CD86+ y marcadas con PKH) de paciente tras co-cultivo de 7,5 horas. En este caso las CPA se han madurado previamente tras exposición a lipopolisacárido (LPS). Se observa un 4% de eventos CD3+PKH+ viables.

25 **Figura 5.** Linfocitos T de donante (CD3+) y células presentadoras de antígeno (CD86+ y marcadas con PKH) de paciente tras co-cultivo de 10 horas. Se observa un 2,41% de eventos CD3+PKH+ viables.

30 **Figura 6.** Linfocitos T de donante (CD3+) y células presentadoras de antígeno (CD86+ y marcadas con PKH) de paciente tras co-cultivo de 10 horas. En este caso las CPA se han madurado previamente tras exposición a lipopolisacárido (LPS) Se observa un 5% de eventos CD3+PKH+ viables.

35 **Figura 7.** Linfocitos T de donante (CD3+) y células presentadoras de antígeno (CD86+ y marcadas con PKH) de paciente tras co-cultivo de 15 horas. Se observa un 1,15% de eventos CD3+PKH+ viables.

40 **Figura 8.** Linfocitos T de donante (CD3+) y células presentadoras de antígeno (CD86+ y marcadas con PKH) de paciente tras co-cultivo de 15 horas. En este caso las CPA se han madurado previamente tras exposición a lipopolisacárido (LPS). Se observa un 2,88% de eventos CD3+PKH+ viables.

45 **Figura 9.** Linfocitos T de donante (CD3+) y células presentadoras de antígeno (CD86+ y marcadas con PKH) de paciente tras co-cultivo de 17,5 horas. Se observa un 1,99% de eventos CD3+PKH+ viables.

50 **Figura 10.** Linfocitos T de donante (CD3+) y células presentadoras de antígeno (CD86+ y marcadas con PKH) de paciente tras co-cultivo de 17,5 horas. En este caso las CPA se han madurado previamente tras exposición a lipopolisacárido (LPS). Se observa un 4,15% de eventos CD3+PKH+ viables.

**Figura 11.** Cultivo mixto secundario de células efectoras (CE) : diana (D) proporción 3:1 siendo (CE) linfocitos que no formaron dobletes en el cultivo primario y (D) células mononucleadas del mismo origen que en el cultivo primario.

**Figura 12.** Cultivo mixto secundario de células efectoras (CE) : diana (D) proporción 3:1 siendo (CE) linfocitos que sí formaron dobletes en el cultivo primario y (D) células mononucleadas de distinto origen / sujeto que en el cultivo primario.

5 **Figura 13.** Cultivo mixto secundario de células efectoras (CE) : diana (D) proporción 3:1 siendo (CE) linfocitos que sí formaron dobletes en el cultivo primario y (D) células mononucleadas del mismo origen / sujeto que en el cultivo primario. A diferencia de los casos expuestos en las figuras 11 y 12 se produce activación linfocitaria

10

### Descripción de la invención

La presente invención se enfrenta, entre otros, al problema de eliminar los linfocitos aloreactivos manteniendo una respuesta citotóxica adecuada frente a las células tumorales.

15

Para ello, los autores de la presente invención llevaron a cabo cultivos mixtos de linfocitos T de donante con células mononucleadas (CMN) de "receptor" irradiadas con 30 Gy (obtenidas mediante buffy coats y/o aféresis) en Flask de 175 cm<sup>2</sup> RPMI-1640 con 10% suero AB en diferentes proporciones para confirmar la proporción óptima para obtener una alodeplección adecuada. Se evaluó también el tiempo óptimo de co-cultivo (entre 48-96 horas), el momento óptimo para añadir bortezomib (24-72 horas tras el inicio del cultivo) y la concentración más adecuada (entre 500-1000ngr/mL). En este sentido resultó que el tiempo óptimo de co-cultivo fue de 96 horas, utilizando una proporción 3:1 y una concentración de 1000 ngr/mL añadidos a las 48 horas de iniciado el cultivo.

25

Tras confirmar la alodeplección del producto éste se expuso a células tumorales previamente irradiadas procedentes del mismo paciente durante 48 horas. Es decir, se realizó un cultivo mixto de las células efectoras (LT CD3+) alodepleccionadas con células tumorales del paciente. Las células tumorales se marcaron con PKH-67, de manera que no fue necesario conocer el fenotipo exacto de la célula tumoral para el desarrollo de este procedimiento. A través de un citómetro de flujo se seleccionaron aquellos eventos CD3+ PHK+ que estaban formando dobletes, dichos eventos se identificaron además por FSC/SSC. Los linfocitos T así seleccionados, tras 24 horas en cultivo, se enfrentarán *in vitro* en un cultivo secundario, en diferentes proporciones, a células tumorales no irradiadas para realización de estudios de citotoxicidad mediante marcaje con anexina / 7AAD para comprobar el efecto citotóxico de los LT obtenidos sobre las células diana tumorales. Como control negativo se realizó el mismo estudio empleando como células estimuladoras CMN normales procedentes del mismo paciente y/o CMN de una tercera persona. Sorprendentemente este nuevo procedimiento permitió eliminar los linfocitos aloreactivos manteniendo una respuesta citotóxica adecuada frente a las células tumorales del paciente y por lo tanto permitiendo separar el EICL de la EICH.

30

35

40

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento (de aquí en adelante "procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención") para la selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados que comprende las siguientes etapas:

45

- a. generar un cultivo mixto *in vitro* que comprenda linfocitos T (células efectoras) del donante y células del receptor, exponiendo dicho cultivo a un inhibidor del NF-kB para generar la alodeplección selectiva de los linfocitos T alorreactivos;

b. generar un segundo cultivo mixto in vitro que comprenda los linfocitos T (células efectoras) una vez han sido alodepleccionados del paso a) y células que presenten al menos un antígeno de interés (células diana) del receptor;

5 c. seleccionar células que estén formando uniones estables (dobletes), identificándose éstas por su positividad para un antígeno T específico y para un marcador específico o no de las células diana;

d. separar las células efectoras de las células diana que forman los dobletes seleccionados en el paso c); y

e. opcionalmente aislar las células efectoras de las células diana.

10

En el contexto de la presente invención se entiende por linfocitos T aquellas células que presentan núcleos de forma ovoide que ocupan la mayoría del espacio intracelular. Los linfocitos T son los responsables de coordinar la respuesta inmune celular constituyendo el 70% del total de los linfocitos que segregan proteínas o citoquinas. También se ocupan de realizar la cooperación para desarrollar todas las formas de respuestas inmunes, como la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Se diferencian de los linfocitos B y de las células asesinas (natural killer o NK) por poseer un receptor especial en la superficie de la membrana, el receptor de linfocitos T (denominado TCR por T cell receptor).

15

20

En el contexto de la presente invención se entiende por célula diana cualquier tipo de célula incluyendo células procariotas (tanto células de arqueas como de bacterias) y células eucariotas (tanto células de animales y vegetales como de hongos y protistas). Preferentemente, dichas células se seleccionan de la lista que consiste en células dendríticas, células mononucleares, células tumorales o bacterias. Adicionalmente, se hace notar que células diana presentadoras de antígenos tales como las células dendríticas o mononucleares, pueden haberse incubado previamente en presencia de algún péptido de interés, para que de esta forma al realizarse el cultivo mixto con LT autólogos se puedan obtener LT específicos frente a ese péptido. Así estas células pueden haberse incubado previamente al paso a) en presencia de péptidos derivados de patógenos tales como: citomegalovirus (CMV), adenovirus (ADV), virus de Epstein-Barr o cualquier otro patógeno.

25

30

Adicionalmente, cualquier célula modificada genéticamente para que exprese un antígeno de interés en su superficie queda dentro del concepto de "célula diana" descrito en la presente invención.

35

Con relación a la última etapa del prodecimiento, etapa e), se hace notar que dado que las células diana estarán en proceso de apoptosis una vez se hayan producido las uniones estables entre las células (dobletes), por el efecto de los linfocitos, para aislar dichos linfocitos T y poder por tanto infundir este producto bastaría con hacer un lavado por gradiente de densidad para obtener de esta manera la capa mononuclear ya que las células en apoptosis se separarían de los linfocitos. Alternativamente se podría proceder a una selección inmunomagnética por CD3 y de esta forma aislar la células efectoras de las células diana.

40

45

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, las células diana del paso a) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención, se seleccionan de la lista que consiste en células mononucleadas o células dendríticas. Adicionalmente, las células diana del receptor del paso b) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención, se seleccionan de la lista que consiste en células mononucleadas, células tumorales y células dendríticas.

50

Por otro lado, en función del tiempo de co-cultivo del paso b), esto es, del tiempo de exposición de los linfocitos T a las células diana antes de llevar a cabo la selección de los dobletes por su doble positividad, varía el porcentaje de “dobletes” observados. Por lo tanto, en otra realización preferida del primer aspecto de la invención el cultivo mixto del paso b) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención, se mantiene por un período entre 3 y 24 horas, preferentemente entre 10 y 17,5 horas, más preferentemente el cultivo mixto se mantiene por un periodo de 15 horas.

10 En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la selección de los dobletes del paso c) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención se realiza por citometría de flujo o “cell sorting”. Preferentemente los dobletes se identifican por su positividad para el antígeno de superficie T específico CD3 y para el marcador de las células diana PKH-67.

15 En otra realización preferida de la invención, la separación de las células efectoras de las células diana del paso d) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos de la invención se realiza incubando los dobletes del paso b) en placas de cultivo en presencia de medio RPMI con 10% de SAB durante un periodo de 10 a 15 horas.

20 En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el inhibidor del NF-kB del paso a) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados de la invención es bortezomib.

25 Adicionalmente, se hace notar que la alodeplección del producto, paso a), se puede realizar previa o posteriormente a la selección de los linfocitos T antígeno-específicos. Preferentemente dicha alodeplección se realiza previamente a la selección de los linfocitos.

30 Adicionalmente y visto el éxito del procedimiento anterior, los autores de la presente invención llevaron a cabo el mismo procedimiento, pero sin alodeplección previa con el objeto de desarrollar un método general de identificación de LT antitumorales antígeno específicos basado en la selección de “dobletes”. Es decir, basado en la selección de aquellas células que estén formando uniones estables (dobletes), identificándose éstas por su positividad para un antígeno T específico y para un marcador de las células diana.

35 Para ello, los autores de la presente invención obtuvieron linfocitos de muestras de sangre periférica (o buffy coats), diluyéndose éstas con suero fisiológico para separar la fracción mononucleada mediante centrifugación (1600rpm durante 30 minutos) por gradiente de densidad con Ficoll. Los linfocitos T CD3+ (células efectoras) así obtenidos se separaron inmunomagnéticamente. A continuación, en placas de cultivo se llevaron a cabo una serie de  
40 cultivos mixtos de las células efectoras (LT CD3+) arriba mencionadas con células diana (células dendríticas) marcadas con PKH-67, dicho co-cultivo se realizó teniendo en cuenta que las células efectoras y las células diana eran de distinto origen, es decir, eran co-cultivos de tipo alogénico. Transcurridas entre 5 y 17,5 horas de co-cultivo se procedió al marcaje de las muestras con anticuerpos monoclonales para la identificación de linfocitos T; las células  
45 diana se identificaron por su positividad para PKH. La separación celular de los dobletes se hizo mediante citometría de flujo o “Cell Sorting”. Los cultivos celulares se manipularon en campana de flujo laminar y se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C en una atmósfera de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

50 En las figuras adjuntas puede apreciarse cómo, después del co-cultivo de linfocitos T con células diana se identificaron “dobletes” formados por linfocitos T (CD3+) y células diana



(CD86+ y a la vez marcadas con PKH-67 y por tanto también positivas para este marcador). En función del tiempo de co-cultivo previo, esto es, del tiempo de exposición de los linfocitos T a las células diana, varió el porcentaje de “dobletes” observados. De hecho a las 15 horas de co-cultivo se consiguió la máxima eficiencia, si bien se observa la formación de dobletes en todo el rango de horas utilizadas. Asimismo, también se modifica el porcentaje en función de que las células dendríticas hayan sido previamente estimuladas con el lipopolisacárido (LPS).

Adicionalmente, en las figuras 1 a 10 adjuntas puede apreciarse cómo es posible distinguir linfocitos (CD3+) que no forman dobletes con las células diana (por tanto, son CD3+ y CD86 ó PKH-67 negativos) de los que sí forman dobletes, debido a su positividad para CD3 y para CD86 ó PKH-67. La primera población (CD3+CD86- / PKH-67 -) , por tanto, no se une de manera estable a las células diana mientras que la segunda población se une con la intensidad suficiente como para que la unión sea estable incluso durante el paso de la muestra por el sorter lo cual es un aspecto sorprendente si tenemos en cuenta la inestabilidad de este tipo de uniones.

Después de la separación celular mediante un citometro de flujo (valdría cualquier otro procedimiento que permita seleccionar los dobletes generados) éstos se incubaron en placas de cultivo en presencia de medio RPMI con 10% de SAB durante un periodo de 10-15h. En el transcurso de este tiempo los linfocitos T CD3 efectores antígeno-específicos se separaron de las células diana marcadas con PKH-67 obteniéndose así los linfocitos T antígeno-específicos. En este sentido, se hace notar que los linfocitos T CD3 efectores antígeno-específicos así obtenidos se separaron de las células diana marcadas con PKH-67 porque la unión entre ambas se produce a través del receptor TCR y, tal y como se ha comentado, se trata de una unión inestable. En este sentido, adicionalmente al sorprendente hecho que dicha unión sea de la suficiente intensidad como para que la unión sea estable incluso durante el paso de la muestra por el citometro de flujo, otra de las claves de la presente invención, radica en haber podido identificar el rango de tiempo que han de permanecer las células en co-cultivo para que haya más uniones estables y por lo tanto mayores posibilidades de aislar con éxito dichos linfocitos T antígeno específicos.

Como puede apreciarse en las figuras de cultivos mixtos secundarios (figuras 11 a 13), los linfocitos T que no formaron dobletes (eran CD3+ CD86- ó PKH-67 -) al enfrentarse de nuevo en un cultivo secundario con las mismas células diana que en el primario, no expresaron marcadores de activación. En cambio, los linfocitos que sí habían formado uniones estables con las células diana (CD3+ CD86+ ó PKH-67+) cuando se enfrentaban a las mismas células diana que en el cultivo primario sí expresaban marcadores de activación (CD25+) mientras que cuando se enfrentaban a otras células diana diferentes de las del cultivo primario, no expresaban marcadores de activación.

Todo lo anterior indica que mediante este nuevo procedimiento se seleccionan linfocitos T específicos frente a una célula diana cuyos antígenos pueden ser conocidos o no. Estos linfocitos formarían uniones estables con la célula diana que podrían identificarse por su doble positividad a CD3+ y PKH-67+ o a cualquier otro marcador específico de la célula diana normal, presentadora de antígenos – por ejemplo derivados de patógenos- o tumoral. De hecho en cultivos secundarios, se confirma que estos linfocitos se activan de manera selectiva cuando se enfrentan a las mismas células diana que en el cultivo primario, lo que no ocurre cuando se enfrentan a otras células diana, lo que confirma su especificidad. Por el contrario, los linfocitos que no han formado uniones estables (esto es, “dobletes”) no se activan en el cultivo secundario, esto es, no son reactivos, frente a las células diana utilizadas en el cultivo primario.

Por lo tanto, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento (de aquí en adelante “procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos de la invención”) para la selección de linfocitos T antígeno-específicos que comprende las siguientes etapas:

- a. generar un cultivo mixto *in vitro* que comprenda linfocitos T (células efectoras) y células que presenten al menos un antígeno de interés (células diana);
- b. seleccionar células que estén formando uniones estables (dobletes), identificándose éstas por su positividad para un antígeno T específico y para un marcador específico o no de las células diana;
- c. separar las células efectoras de las células diana que forman los dobletes seleccionados en el paso b); y
- d. opcionalmente aislar la células efectoras de las células diana.

Con relación a la última etapa del procedimiento, etapa d), se hace notar que dado que las células diana estarán en proceso de apoptosis una vez se hayan producido las uniones estables entre las células (dobletes), por el efecto de los linfocitos, para aislar dichos linfocitos T y poder por tanto infundir este producto bastaría con hacer un lavado por gradiente de densidad para obtener de esta manera la capa mononuclear ya que las células en apoptosis se separarían de los linfocitos. Alternativamente se podría proceder a una selección inmunomagnética por CD3 y de esta forma aislar la células efectoras de las células diana.

Por otro lado, tal y como se ha comentado anteriormente, en función del tiempo de co-cultivo del paso a), esto es, del tiempo de exposición de los linfocitos T a las células diana antes de llevar a cabo la selección de los dobletes por su doble positividad, varía el porcentaje de “dobletes” observados. Por lo tanto, en una realización preferida del segundo aspecto de la invención el cultivo mixto del paso a) se mantiene por un periodo entre 3 y 24 horas, preferentemente entre 10 y 17,5 horas, más preferentemente el cultivo mixto se mantiene por un período de 15 horas.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, la selección de los dobletes del paso b) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos de la invención se realiza por citometría de flujo o “cell sorting”. Preferentemente los dobletes se identifican por su positividad para el antígeno de superficie T específico CD3 y para el marcador de las células diana PKH-67. No obstante, cualquier otro marcador específico de la célula diana normal, presentadora de antígenos – por ejemplo derivados de patógenos- o tumoral serviría para poner en práctica la presente invención.

En aún otra realización preferida de la invención, la separación de las células efectoras de las células diana del paso c) del procedimiento de selección de linfocitos T antígeno-específicos de la invención se realiza incubando los dobletes del paso b) en placas de cultivo en presencia de medio RPMI con 10% de SAB durante un periodo de 10 a 15 horas.

Por otro lado, un tercer aspecto de la invención, se refiere a los linfocitos T obtenibles de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención así como por cualquiera de sus realizaciones preferidas. Asimismo, una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende los linfocitos T obtenibles de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención así como por cualquiera de sus realizaciones preferidas. Preferentemente dicha composición es una composición farmacéutica que opcionalmente además comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a los linfocitos T obtenibles de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención así como por cualquiera de sus realizaciones preferidas, para su uso en terapia. En una realización particular del cuarto aspecto de la invención los Linfocitos T así obtenidos se usan para la realización de trasplantes.

5 Alternativamente, los Linfocitos T así obtenidos se utilizan para la elaboración de un medicamento para su uso en trasplantes. Preferentemente para su uso en el trasplante hematopoyético.

10 A continuación los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y en ningún caso limitativos de la presente invención.

### Ejemplos

15 Ejemplo 1. Cultivo primario mixto de las células efectoras (LT CD3+) con células diana (células dendríticas) marcadas con PKH-67.

20 Para la obtención de linfocitos, las muestras de sangre periférica (o buffy coats) se diluyeron con suero fisiológico y se separó la fracción mononucleada mediante centrifugación (1600rpm durante 30 minutos) por gradiente de densidad con Ficoll. Los linfocitos T CD3 se separaron inmunomagnéticamente a partir del producto obtenido. En placa de cultivo se llevaron a cabo varios cultivos mixtos de células efectoras (LT CD3+) con células diana (células dendríticas) marcadas con PKH-67. Transcurridos distintos tiempos de co-cultivo (ver figuras 1 a 10) se procedió al marcaje de la muestra con Ac monoclonales para la  
25 identificación de linfocitos T; las células diana se identificaron por su positividad para PKH. La separación celular de los dobletes se hizo mediante citometría de flujo o "Cell Sorting". Los cultivos celulares se manipularon en campana de flujo laminar y se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C en una atmósfera de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

30 Trás la separación celular mediante sorting de los dobletes generados según se ha especificado anteriormente, éstos se incubaron en placas de cultivo en presencia de medio RPMI con 10% de SAB durante un periodo de 12 horas. En el transcurso de este tiempo los linfocitos T CD3 efectores antígeno-específicos se separaron de las células diana marcadas con PKH-67.

35 Ejemplo 2. Cultivos secundarios para comprobar la reactividad frente a las células diana de los linfocitos obtenidos en el ejemplo 1.

40 Tal y como puede apreciarse en las figuras 11 a 13 de cultivos mixtos secundarios, los linfocitos T que no formaron dobletes (eran CD3+ CD86- ó PKH-67-) al enfrentarse de nuevo en un cultivo secundario con las mismas células diana que en el primario, no expresan marcadores de activación. En cambio, los linfocitos que sí habían formado uniones estables con las células diana (CD3+ CD86+ ó PKH-67+) cuando se enfrentaban a las mismas células diana que en el cultivo primario sí expresaban marcadores de activación (CD25+) mientras  
45 que cuando se enfrentaban a otras células diana diferentes de las del cultivo primario, no expresaban marcadores de activación.

50

**Reivindicaciones**

1. Procedimiento para la selección de linfocitos T antígeno-específicos que comprende las siguientes etapas:
  - 5 a. generar un cultivo mixto *in vitro* que comprenda linfocitos T (células efectoras) y células que presenten al menos un antígeno de interés (células diana);
  - b. seleccionar células que estén formando uniones estables (dobletes), identificándose éstas por su positividad para un antígeno T específico y para un marcador específico o no de las células diana; y
  - 10 c. separar las células efectoras de las células diana que forman los dobletes seleccionados en el paso b); y
  - d. opcionalmente aislar las células efectoras de las células diana.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, dónde las células diana se seleccionan de la lista que consiste en células dendríticas, células mononucleares, células tumorales o bacterianas.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde el cultivo mixto del paso a) comprende linfocitos T (células efectoras) y células que presenten al menos un antígeno de interés (células diana) de distintos individuos (células alogénicas) y se mantiene por un período entre
  - 20 3 y 24 horas.
4. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde el cultivo mixto del paso a) comprende linfocitos T (células efectoras) y células que presenten al menos un antígeno de interés (células diana) de distintos individuos (células alogénicas) y se mantiene por un período entre
  - 25 10 y 17,5 horas.
5. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde el cultivo mixto del paso a) comprende linfocitos T (células efectoras) y células que presenten al menos un antígeno de interés (células diana) de distintos individuos (células alogénicas) y se mantiene por un período de 15
  - 30 horas.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la selección de los dobletes del paso b) se realiza por citometría de flujo.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde los dobletes se identifican por su positividad para el antígeno de superficie T específico CD3 y para el marcador de las células diana PKH-67.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, dónde la separación de las células efectoras de las células diana del paso c) se realiza incubando los dobletes del paso b) en placas de cultivo en presencia de medio RPMI con 10% de SAB durante un período de 10 a 15 horas.
9. Procedimiento para la selección de linfocitos T antígeno-específicos alodepleccionados que comprende las siguientes etapas:
  - 45 a. generar un cultivo mixto *in vitro* que comprenda linfocitos T (células efectoras) del donante y células del receptor, exponiendo dicho cultivo a un inhibidor del NF-kB para generar la alodeplección selectiva de los linfocitos T alorreactivos;
  - b. generar un segundo cultivo mixto *in vitro* que comprenda los linfocitos T (células efectoras) una vez han sido alodepleccionados del paso a) y células que presenten al
    - 50 menos un antígeno de interés (células diana) del receptor;

- c. seleccionar células que estén formando uniones estables (dobletes), identificándose éstas por su positividad para un antígeno T específico y para un marcador específico o no de las células diana; y
- 5 d. separar las células efectoras de las células diana que forman los dobletes seleccionados en el paso c); y
- e. opcionalmente aislar la células efectoras de las células diana.
- 10 10. Procedimiento según la reivindicación 9, dónde las células diana del receptor se seleccionan de la lista que consiste en células mononucleadas ó células dendríticas.
- 15 11. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, donde las células diana del receptor se seleccionan de la lista que consiste en células mononucleadas, células tumorales y células dendríticas.
- 20 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde el cultivo mixto del paso a) comprende linfocitos T (células efectoras) y células que presenten al menos un antígeno de interés (células diana) de distintos individuos (células alogénicas) y se mantiene por un período entre 3 y 24 horas.
- 25 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde el cultivo mixto del paso a) es un co-cultivo entre células alogénicas que se mantiene por un período entre 10 y 17,5 horas.
- 30 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde el cultivo mixto del paso a) es un co-cultivo entre células alogénicas que se mantiene por un período de 15 horas.
- 35 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde la selección de los dobletes del paso b) se realiza por citometria de flujo.
- 40 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, donde los dobletes se identifican por su positividad para el antígeno de superficie T específico CD3 y para el marcador de las células diana PKH-67.
- 45 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, donde la separación de las células efectoras de las células diana del paso c) se realiza incubando los dobletes del paso b) en placas de cultivo en presencia de medio RPMI con 10% de SAB durante un período de 10 a 15 horas.
- 50 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, dónde el inhibidor del NF-kB es bortezomib.
19. Linfocitos T obtenibles de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
20. Uso de los linfocitos T obtenibles de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 18 para la elaboración de un medicamento para su uso en trasplantes.
21. Uso de los linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 20, donde el trasplante es el trasplante hematopoyético.

22. Composición que comprende los linfocitos T obtenibles de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

5 23. La composición de la reivindicación 22, donde dicha composición es una composición farmacéutica que opcionalmente comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.