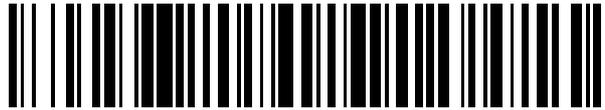


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 241**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2005 E 05724896 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 1730260**

54 Título: **Células T reguladoras y su uso en inmunoterapia y supresión de respuestas autoinmunitarias**

30 Prioridad:

05.03.2004 US 550481 P
19.04.2004 US 827023

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2016

73 Titular/es:

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US

72 Inventor/es:

BLAZAR, BRUCE, R.;
JUNE, CARL;
GODFREY, WAYNE, R.;
CARROLL, RICHARD, G.;
LEVINE, BRUCE;
RILEY, JAMES, L. y
TAYLOR, PATRICIA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 581 241 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

Células T reguladoras y su uso en inmunoterapia y supresión de respuestas autoinmunitarias

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a células T reguladoras y a métodos para expandir en cultivo, activar y usar las mismas a largo plazo en inmunoterapia y para la supresión de respuestas autoinmunitarias, incluida la enfermedad de injerto contra hospedante (GVHD).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Por mucho tiempo se ha pensado que las células supresoras cumplen una función en la progresión del cáncer (Dye et al., J. Exp. Med. 154:1033-1042 (1981)). De hecho, la supresión activa por parte de células reguladoras T cumple una importante función en la disminución de respuestas de células T a xenoantígenos y autoantígenos.

15 Las células T son una clase de linfocitos, que tienen receptores de células T específicos (TCR) que se producen como consecuencia de la redistribución de genes. Las células T tienen diversas funciones, que se logran mediante la diferenciación de distintos subconjuntos de células T, reconocibles por patrones discretos de expresión génica. Se reconocen varios subconjuntos importantes de células T en función de la expresión de receptores, tales como TCR- α/β y TCR γ/δ y linfocitos citolíticos naturales invariables. Otros subconjuntos de células T son definidos por las moléculas superficiales y las citocinas allí segregadas. Por ejemplo, los linfocitos T cooperadores (células CD4) segregan citocinas, y ayudan a las células B y a las células T citotóxicas a sobrevivir y llevar a cabo funciones efectoras. Las células T citotóxicas (CTL) son en general células CD8, y se especializan en destruir células diana, tales como células infectadas o células tumorales. Los linfocitos citolíticos naturales (NK) se relacionan con las células T, pero no tienen TCR, y tiene un periodo de vida más corto, aunque comparten las mismas funciones con las células T y son capaces de segregar citocinas y destruir algunas clases de células diana.

20 La sangre periférica humana y de ratón contiene una pequeña población de linfocitos T que expresan el fenotipo regulador T ("Treg"), es decir, positivo para los antígenos CD4 y CD25 (es decir, aquellas células T CD4⁺ que son también claramente positivas para CD25). Primero caracterizada en ratones, en donde constituye el 6-10% de las poblaciones de células T CD4⁺ de ganglios linfáticos y bazo, esta población de células CD4⁺CD25⁺ representa aproximadamente tan solo el 5-10% de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), o el 2-7% de células T CD4⁺, aunque algunos donantes exhiben una población más distintiva de células CD4⁺ y CD25⁺. Aproximadamente el 1-2% de las PBMC de sangre periférica humana son células CD4⁺ positivas (CD4⁺) y CD25⁺ brillantemente positivas (CD25⁺).

30 Existen varios subconjuntos de células Treg (Bluestone et al., Nature Rev. Immunol. 3:253 (2003)). Un subconjunto de células reguladoras se desarrolla en el timo. Las células Treg derivadas del timo funcionan mediante un mecanismo independiente de citocinas, que implica el contacto de una célula con otra (Shevach, Nature Rev. Immunol. 2:389 (2002)). Son esenciales para la inducción y el mantenimiento de autotolerancia y para la prevención de autoinmunidad (Shevach, Annu. Rev. Immunol. 18:423-449 (2000); Stephens et al., 2001; Taams et al., 2001; Thornton et al., 1998; Salomon et al., Immunity 12:431-440 (2000); Sakaguchi et al., Immunol. Rev. 182:18-32 (2001)). Estas células reguladoras profesionales previenen la activación y proliferación de células T autorreactivas que han escapado de la supresión tímica o que reconocen antígenos extratímicos, por tanto son críticas para la homeostasis y la regulación inmunitaria, así como también para la protección del hospedante contra el desarrollo de autoinmunidad (Suri-Payer et al., J. Immunol. 157:1799-1805 (1996); Asano et al., J. Exp. Med. 184:387-396 (1996); Bonomo et al., J. Immunol. 154:6602-6611 (1995); Willerford et al., Immunity 3:521-530 (1995); Takahashi et al., Int. Immunol. 10:1969-1980 (1998); Salomon et al., Immunity 12:431-440 (2000); Read et al., J. Exp. Med. 192:295-302 (2000). Por lo tanto, las células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras, inmunitarias a menudo se denominan "células supresoras profesionales".

45 Sin embargo, las células Treg pueden también generarse por la activación de células T CD4⁺ periféricas maduras. Los estudios han indicado que las células Treg que derivan de la periferia median sus actividades inhibitoras produciendo citocinas inmunosupresoras, tal como transformando el factor de crecimiento factor-beta (TGF- β) y la IL-10 (Kingsley et al., J. Immunol. 168:1080 (2002); Nakamura et al., J. Exp. Med. 194:629-644 (2001)). Después de la activación específica de antígenos, estas células Treg pueden suprimir no específicamente la proliferación o bien de células T CD4⁺ o CD25⁺ (demostrada por clasificación FACS en ensayos de supresión en co-cultivo basados en mAb anti-CD3 inmovilizado en bajas dosis por Baecher-Allan et al., J. Immunol. 167(3):1245-1253 (2001)).

50 Los estudios han demostrado que las células CD4⁺CD25⁺ son capaces de inhibir la estimulación anti-CD3 de las células T cuando se cultivan conjuntamente con células presentadoras de autoantígenos (APC), pero solamente a través del contacto directo (Stephens et al., Eur. J. Immunol. 31:1247-1254 (2001); Taams et al., Eur. J. Immunol. 31:1122-1131 (2001); Thornton et al., J. Exp. Med. 188:287-296 (1998)). No obstante, en ratones, este efecto inhibitor no pudo superar la estimulación de células T directa con anti-CD3 o con anti-CD3/CD28 inmovilizado (Thornton et al., 1998). En informes previos, las células T CD4⁺CD25⁺ humanas aisladas de sangre periférica requirieron la preactivación con el fin de revelar sus propiedades supresoras, ya que el cultivo directo de las células reguladoras en general era insuficiente para mediar los efectos supresores (Dieckmann et al., J. Exp. Med.

193:1303-1310 (2001)). Otros han hallado que las propiedades inhibitoras de células T CD4⁺CD25⁺ humanas dependen de la activación, pero no son específicas de antígenos (Jonuleit et al., J. Exp. Med. 193:1285-1294 (2001); Levings et al., J. Exp. Med. 193(11):1295-1302 (2001); Yamagiwa et al., J. Immunol. 166:7282-7289 (2001)), y han demostrado la expresión constitutiva de almacenamientos intracelulares de antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) (Jonuleit et al., 2001; Read et al., J. Exp. Med. 192:295-302 (2000); Yamagiwa et al., 2001; Takahashi et al., J. Exp. Med. 192:303-310 (2000)). Asimismo, después de la estimulación mediada por los receptores de células T (TCR), las células T CD4⁺CD25⁺ suprimen la activación de células T CD4⁺CD25⁺ vírgenes activadas por aloantígenos y mitógenos (Jonuleit et al., 2001).

Tanto las células Treg de ratón como las humanas expresan CTLA-4, no obstante, la función del CTLA-4 en inducción de tolerancia y su capacidad de impartir la función inhibitora para las células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras es controversial. El CTLA-4 (también conocido como CD152) es un homólogo de CD28 y es un receptor para los ligandos CD80 y CD86. El CTLA-4 inhibe las respuestas de las células T en un modo dependiente de antígenos y TCR. Las células T que han obstaculizado la función del CTLA-4 han reforzado la proliferación de células T y la producción de citocinas. En contraste, la función mejorada de los CTLA-4 conduce a una inhibición en la segregación de citocinas y a la obstaculización del avance del ciclo celular, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el ratón, el CTLA-4 no se requiere para la función supresora de las células Treg, en oposición a su requerimiento en seres humanos. Esto puede explicarse en parte por el descubrimiento reciente de que hay múltiples formas de CTLA-4, y de que este puede variar entre cepas de ratones o seres humanos.

Un estudio reciente ha demostrado que las células Treg se desarrollan ampliamente *in vivo* (Tang, J. Immunol. 171:3348 (2003)), mientras que otros han sugerido que la eficacia de la vacuna terapéutica contra el cáncer en ratones puede mejorarse eliminando las células T CD4⁺CD25⁺ (Sutmuller et al., J. Exp. Med. 194:823-832 (2001)). Los estudios también han indicado que la disminución del número de células reguladoras condujo a un aumento de las respuestas inmunitarias específicas de tumores y a la erradicación de tumores en animales que no respondían de ninguna otra manera (Onizuka et al., Cancer Res. 59:3128-3133 (1999); Shimizu et al., J. Immunol. 163:5211-5218 (1999)). Las cepas de ratones susceptibles que se tornaron deficientes de CD4⁺CD25⁺ por timectomía neonatal demostraron desarrollar un amplio espectro de autoinmidades específicas de los órganos que pudieron prevenirse con una infusión de células T CD4⁺CD25⁺ a los 10-14 días de vida (Suri-Payer et al., J. Immunol. 160:1212-1218 (1998)). Ese estudio también halló que las células T CD4⁺CD25⁺ inhiben la autoinmunidad inducida por clones de células T específicos de autoantígenos. También se informó que la transferencia de células T CD4⁺CD25⁺ a ratones atímicos también condujo al desarrollo de trastornos autoinmunitarios que podrían prevenirse mediante la co-transferencia de células T CD4⁺CD25⁺ usando linfocitos primero despojados de células CD25⁺ (Sakaguchi et al., J. Immunol. 155:1151-1164 (1995)).

No obstante, los datos también indican que la función de las células CD4⁺CD25⁺ no se limita a la autotolerancia y la prevención de autoinmunidad. Si bien algunos estudios se han dirigido a la función de las células T CD4⁺CD25⁺ en alorrespuestas o en trasplante, se ha informado que las células T CD4⁺CD25⁺ previenen el rechazo de aloinjertos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Hara et al., J. Immunol. 166:3789-3796 (2001); Taylor et al., J. Exp. Med. 193:1311-1318 (2001)). La estimulación alogénica de proliferación de células T humanas también es bloqueada por células T CD4⁺CD25⁺ (Yamagiwa et al., 2001), mientras que el laboratorio de Wood ha demostrado que las células T CD4⁺CD25⁺ suprimen las respuestas linfocitarias mixtas (MLR), pero solamente cuando el aloantígeno fue presentado por la vía indirecta, y no directa, de alorreconocimiento (Hara et al., 2001). Es probable que la presentación de antígenos directa ocurra entre las células T reguladoras y las células T respondedoras estimuladas por anti-CD3/28, ya que las células CD4⁺25⁺ clasificadas son altamente desprovistas de APC profesionales.

Los inventores han demostrado que las células T CD4⁺CD25⁺ existen en altas proporciones en linfocitos infiltrantes de tumores de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (Woo et al., Cancer Res. 61:4766-4772(2001)), y que las células CD4⁺CD25⁺ fueron un requisito esencial para la inducción *ex vivo* de tolerancia a aloantígenos mediante el bloqueo co-estimulador (Taylor et al., J. Exp. Med. 193:1311-1318 (2001)). La mayoría de la bibliografía, no obstante, indica que el sistema inmunitario está en un estado de ignorancia a los tumores sólidos periféricos, por lo tanto es anérgico (Ochsenbein, et al., Nature 411:1058-1064 (2001); Staveley-O'Carroll et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1178-1183 (1998)). La explicación para la capacidad diferencial de las células T CD4⁺CD25⁺ de suprimir la proliferación de células T autólogas y alogénicas es muy probablemente compleja. En consecuencia, la función de las células T CD4⁺CD25⁺ en tumores humanos o cualquier efecto que puedan tener en prevenir que el hospedante monte una respuesta inmunitaria a autoantígenos, hasta la fecha se desconoce.

Las células Treg se han descrito en la bibliografía como hipoproliferativas *in vitro* (Sakaguchi, Ann. Rev. Immunol. 22:531 (2004)). Trenado et al. proporcionó la primera evaluación de la eficacia terapéutica de células reguladoras CD4⁺CD25⁺ activadas y expandidas *ex vivo* en un modelo animal *in vivo* de enfermedad (Trenado et al., J. Clin. Invest. 112(11):1688-1696 (2002)). En esa situación, la infusión de células CD4⁺CD25⁺ de donantes expandidas y activadas *ex vivo* demostró inhibir significativamente la GVHD rápidamente mortal, sin embargo, estos datos se presentan solamente para ratones, no para seres humanos. A su vez, en los estudios en murinos para las afecciones ensayadas, si bien las células Treg recién aisladas o cultivadas pudieron suprimir la GVHD, hubo efectos de injerto contra leucemia (actividad GVL) (Trenado et al., 2002; Jones et al., Biol. Blood Marrow Transplant 9(4):243-256 (2003); Edinger et al., Nat. Med. 9(9):1144-1150 (2003)), como también reconstitución inmunitaria (Trenado et al., 2002).

No obstante, la sangre humana es bastante diferente en composición de aquella de un ratón, lo que significa que sin experimentación extensa, los estudios murinos no pueden traducirse en respuestas equivalentes en células humanas. La sangre humana contiene células de memoria (~50%), que pueden ser CD25⁺ y superponerse con la población de células supresoras de CD4⁺ CD25⁺, tomando a las células Treg humanas muy difíciles de purificar. En comparación, las células CD25⁺ están solamente mínimamente presentes en roedores, o completamente ausentes en ratones libres de patógenos jóvenes (la condición utilizada en la mayoría de los estudios murinos). En seres humanos, la purificación de Treg basada en la selección de CD25 (el único marcador superficial conocido de células supresoras circulantes, ya que el CTLA-4 no está en la superficie de células nuevas) produce el enriquecimiento de las células Treg, pero no es suficiente para la purificación total. Las poblaciones supresoras parcialmente puras pueden evidenciar brevemente la supresión después del cultivo/activación a corto plazo, pero son rápidamente proliferadas por las células T convencionales contaminantes.

En consecuencia, los hallazgos comparables a aquellos de Trenado *et al.* nunca se han descrito en células humanas. Aquellos informes publicados que demuestran proliferación de células CD4⁺ CD25⁺ no pueden encontrar función supresora, y hasta la presente invención, nadie ha podido obtener amplia expansión *in vitro* o *ex vivo* de células Treg humanas, si bien al mismo tiempo mantienen las condiciones de GMP. La publicación de patente internacional núm.WO02/072799 y Levings *et al.* (2001), describen la expansión de células CD4⁺ CD25⁺ humanas. En Levings *et al.* (2001), solamente se muestra una figura de la función supresora, y se demuestra que solo tiene un efecto modesto. Con una relación 1:1 de células supresoras a células respondedoras, solo se observó aproximadamente 60%-65% de inhibición de la proliferación, menos de lo que se observa normalmente con células Treg de ratones. Por consiguiente, la supresión informada fue de una magnitud tan pequeña que podría haber resultado de efectos no específicos (p. ej., consumo del factor de crecimiento, superpoblación, desplazamiento de las células presentadoras de antígenos, etc). Además, el cultivo fue mantenido por Levings *et al.* solamente por un periodo breve (solamente 14 días), y las células principalmente representan un cultivo mixto de células reguladoras y células T convencionales.

Para cultivar las células Treg, Leavings *et al.* utilizaron células linfoblastoides JY (línea de células linfoblastoides víricamente transformadas EBV) cultivadas con anti-CD3 soluble (1 µg/ml), en presencia de una mezcla celular alimentadora de PBMC alogénicas. Los autores indicaron que la purificación de las células CD4⁺ CD25⁺ se realizó usando un protocolo de microesferas magnéticas de dos etapas, en donde en la primera, las células fueron despojadas de células no T y del tipo de células T CD8, usando anticuerpos hacia CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 y CD56, lo que hace que el producto resultante sea inadecuado para uso terapéutico en seres humanos. Luego, las células se seleccionaron para positividad de CD25.

Incluso así, si bien Leavings *et al.* describieron 90% de pureza de las células Treg, no se describió nada acerca de la rigurosidad. Esto es problemático, dado que un nivel de rigurosidad muy elevado es absolutamente crítico para el aislamiento de células humanas de pureza suficiente (CD25⁺) para generación de la línea celular supresora, un hallazgo que hasta la presente invención no había sido ni analizado ni apreciado en la técnica anterior. No obstante, como se demostrará a continuación, la inadecuación del aislamiento y los métodos de expansión utilizados por otros para la generación de líneas celulares supresoras han interferido significativamente con los avances en la investigación en células Treg humanas. En consecuencia, no ha sido posible usar previamente células Treg eficazmente para propósitos terapéuticos.

Por lo tanto, ha habido una necesidad de métodos para producir una cantidad suficiente de estas células Treg que permitan la caracterización y proporcionen un uso terapéutico seguro y eficaz en pacientes humanos. También permanece la necesidad de una mayor comprensión de las células T CD4⁺ CD25⁺ y su función en la inmunovigilancia de tumores y en la inmunoterapia o inmunosupresión de tumores malignos, particularmente tumores sólidos, tales como tumores de pulmón. Igual de importante ha sido la necesidad de suprimir alorrespuestas *in vivo* y respuestas autoinmunitarias, tales como, aunque sin limitarse a ello, enfermedad injerto contra hospedante (GVHD), y para dilucidar y expandir la función de la terapia celular de CD4⁺ CD25⁺ y definir métodos para aislar o producir dichas células supresoras de CD4⁺ CD25⁺.

Compendio de la invención

En vista de las necesidades precedentemente manifestadas en la técnica, en un primer aspecto de la presente invención se da a conocer un método para producir células reguladoras T (células Treg) CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺-humanas, en donde dicho método comprende:

aislar una población de células T supresoras CD24⁺CD25⁺ humanas de una muestra de células T CD24⁺ usando purificación en columna que usa microesferas de CD25, en donde la purificación de doble columna comprende una primera y una segunda purificación en columna;

y expandir en cultivo las células Treg CD24⁺CD25⁺ *ex vivo* con microesferas con anticuerpos hacia CD3 y CD28, y además de expandir en cultivo dicha población aislada de células Treg CD24⁺CD25⁺ humanas en presencia de IL-2, células alimentadoras irradiadas CD4⁺ o medio acondicionado con células alimentadoras irradiadas CD4⁺, produciendo así células expandidas en cultivo, en donde dichas células Treg expandidas en cultivo son

CD62L⁺/CD27⁺ y pueden inhibir la proliferación de células T respondedoras CD4⁺CD25⁺ en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR) por más de 90%.

5 Manipulando y modulando una subpoblación de células T reguladoras (células Treg), las células T CD4⁺ CD25⁺ pueden ser un componente importante de la inmunoterapia para el cáncer en tumores malignos sólidos, tales como tumores de pulmón, y para la inmunosupresión, inhibición y prevención de alorrespuestas y respuestas autoinmunitarias. Se descubrió que las células T CD4⁺ CD25⁺ median la potente inhibición de la proliferación de células T autólogas; aunque las células T reguladoras de tumores de pacientes no pudieron inhibir la proliferación de células T alogénicas y parecen inducir o mantener la tolerancia a tumores en pacientes con cáncer de pulmón.

10 A su vez, los datos presentados aquí indican que las células CD4⁺ CD25⁺ cumplen una función importante en las alorrespuestas *in vivo*, específicamente la generación de enfermedad injerto contra hospedante (GVHD). La disminución en la cantidad de células CD4⁺ CD25⁺ *ex vivo* de un inóculo de células T de donante o la disminución en el número de CD25 *in vivo* del receptor pre-trasplante produjo un aumento de respuestas GVHD. Estos hallazgos se observaron independientemente de las combinaciones de cepas o del régimen de acondicionamiento de la irradiación corporal total (TBI), y más allá de si la GVHD fue mediada por células T CD4⁺ o por ambas células T CD4⁺ y CD8⁺.

15 En consecuencia, es un objeto de la presente invención también dar a conocer células que se puedan utilizar en métodos para promover el injerto al tejido trasplantado humano, incluidas poblaciones completas o seleccionadas de trasplantes de médula ósea o de sangre, particularmente suprimiendo, inhibiendo, bloqueando o previniendo la GVHD mediante una población de células Treg activadas y fortalecidas por cultivo *ex vivo* y administradas *in vivo*.
20 Ventajosamente, dichos métodos se logran mejor con regímenes de intensidad reducida y con poca o ninguna supresión inmunitaria. Dichos efectos de promoción de injertos se pueden aplicar entonces a pacientes con trasplantes de órganos sólidos como un medio para lograr la tolerancia libre de fármacos con requerimientos de regímenes sin acondicionamiento o con acondicionamiento reducido, o a pacientes con médula ósea alogénica o autoinmunitarios con médula ósea alogénica o con médula ósea autóloga o alogénica, como un modo para restablecer el sistema inmunitario.

25 Por tanto, en otro aspecto de la presente invención, se dan a conocer células Treg CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ expandidas en cultivo *ex vivo* producidas por el método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

30 En otro aspecto de la presente invención, se dan a conocer células reguladoras T CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ humanas producidas por el método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención para uso en la supresión, el bloqueo o la inhibición de la enfermedad injerto contra hospedante después del trasplante de tejido.

35 En otro aspecto de la presente invención, se dan a conocer células reguladoras T CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ humanas por el método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención para uso en la prevención de una alorrespuesta o una respuesta autoinmunitaria, en donde dichas células se preparan para administración antes del inicio de una alorrespuesta o respuesta autoinmunitaria.

40 En otro aspecto de la presente invención, se da a conocer un método *in vitro* para inhibir la expansión de células T alorreactivas y la producción de citocinas que comprende poner en contacto dichas células T alorreactivas con células Treg expandidas en cultivo *ex vivo* CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ producidas por el método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

45 En otro aspecto de la presente invención, se da a conocer un método *in vitro* para inhibir la actividad del CTL que comprende poner en contacto dichas células con células Treg expandidas en cultivo *ex vivo* CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ producidas por el método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

El método de la presente invención da a conocer el tratamiento *ex vivo* de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺, de modo que las células activadas y expandidas en cultivo se pueden infundir en el hospedante para producir una respuesta inmunoterapéutica. Las células T reguladoras utilizadas en el método pueden haber sido obtenidas del paciente o de un donante alogénico.

50 El método de aislamiento celular preferido se diseñó para ser altamente riguroso para el aislamiento de células CD25⁺, una vez que los inventores determinaron que las células CD25⁺ tenues no son supresoras. Como resultado, las células CD25⁺ tenues deben seleccionarse cuidadosamente. Por consiguiente, un nivel muy alto de rigurosidad es absolutamente crítico para el aislamiento de las células de suficiente pureza (CD25⁺) para generación de la línea celular supresora porque las células CD25⁺ tenues pueden desarrollarse más rápido que las células CD25⁺, y si se incluyen en poblaciones de partida se multiplicarán más rápido que las células CD25⁺ e impedirán la manifestación de la función supresora. Ante la ausencia de metodología rigurosa, no es posible aislar las poblaciones supresoras que son lo suficientemente puras para la supresión potente y para el crecimiento a largo plazo.

55 Ventajosamente, el proceso de purificación revelado permite la evaluación de subconjuntos de células CD25. El subconjunto CD45RA, un subconjunto menor que comprende solamente ~15% de células CD25⁺, parece contener la mayoría de las células supresoras capaces de formar una línea celular. Este nuevo hallazgo en la presente

invención ha permitido la generación de líneas celulares supresoras en todos los donantes ensayados (12/12), mientras que los protocolos anteriores en la técnica han demostrado un índice de falla consistente del 10-20% (incluso con la purificación de CD25 extremadamente rigurosa y/o la disminución del linaje).

5 La metodología de cultivo selectiva del primer aspecto de la presente invención permite la generación de una línea celular supresora potente. El método exclusivo de expansión en cultivo comprende un protocolo de disminución del linaje de segunda generación que emplea dos etapas y una microesfera escindible. Se utilizan esferas especiales del tamaño de las células (esferas magnéticas de hierro-dextrano-Dynabeads) recubiertas con anticuerpos hacia CD3 y CD28. El anti-CD28 proporciona señales críticas para el aumento de la activación y el crecimiento de las células Treg hipoproliferativas. Bastante sorprendentemente, los inventores descubrieron que las distintas relaciones de CD3/CD28 tienen ciertos efectos selectivos en cultivo. Las líneas celulares CD4⁺ CD25⁺ desarrolladas con las esferas con baja relación (bajo anti-CD3 en comparación con anti-CD28) son mucho más estables, y menos propensas a proliferarse con las células T convencionales. Las esferas pueden quitarse fácilmente pasando las células cultivadas a través de una columna magnética. No se requiere clasificación celular. Tal como se desarrolla, el método preferido también utiliza células T CD4⁺ autólogas como alimentadoras. Por consiguiente, no hay necesidad de líneas tumorales transformadas para facilitar el crecimiento.

Asimismo, las líneas celulares producidas por los métodos preferidos son uniformes, como lo demuestra la caracterización por citometría de flujo del fenotipo, y pueden cultivarse durante 2 meses o más. Como ventaja adicional, las células expandidas en cultivo retienen una potente actividad supresora funcional (>95% de inhibición, incluso con dilución en una relación 1:10 de célula supresora a célula respondedora, lo que descarta posibles causas no específicas de supresión). Los experimentos de titulación revelan que las células supresoras resultantes pueden titularse en una relación de tan solo 1:16 ("relación supresora: respondedora"), e incluso lograr 90% de supresión

20 Cuando se ensayan, las células supresoras humanas expandidas en cultivo de la presente invención son capaces de 95% de supresión de una MLR, o bien con células CD4⁺ nuevas o con células CD4⁺ CD25 cultivadas como células T respondedoras. A su vez, estas células interferentes CD25 tenues son células de memoria CD45RO⁺ (lo que explica la ausencia en ratones jóvenes libres de patógenos). Mediante el uso de una CD45RA (marcador de células vírgenes) es posible aislar una población limpia de células CD4⁺ CD25⁺ CD45RA⁺, que uniformemente forman líneas celulares supresoras potentes, >90% donantes (n=20). Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención, se da a conocer una población de células Treg CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ activadas y mejoradas en cultivo *ex vivo* producidas por el método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, en donde la inhibición del ensayo de MLR por más de 90% se retiene más de 1 semana y el número de células expandidas es suficiente para la terapia efectiva en seres humanos. Además, los datos funcionales demuestran el bloqueo de la activación de células T respondedoras y la prevención de la producción de citocinas por las células expandidas en cultivo resultantes.

35 Las células CD4⁺ CD25⁺ activadas y expandidas pueden inhibir la proliferación autóloga de células de sangre periférica. Las células CD4⁺ CD25⁺ activadas y expandidas pueden bloquear o prevenir la GVHD, o inhibir o revertir la enfermedad, si ha avanzado. Las células activadas y mejoradas pueden introducirse a un hospedante diferente. Las células pueden establecerse como una línea celular para uso terapéutico continuo.

40 Los métodos de expansión en cultivo también se dan a conocer usando estrategias de expansión alternativas que no necesariamente dependen de las células alimentadoras, tal como mediante el uso de esferas anti-CD3/28 +IL-2. Asimismo, la expansión en cultivo puede lograrse con o sin APC y/o DC del hospedante cuando se usan dichos métodos alternativos como esferas anti-CD3/28 +IL-2. Preferiblemente, el hospedante es un hospedante humano y las células expandidas en cultivo son humanas, aunque las animales, incluidos modelos de animales para enfermedades humanas, también se incluyen en la presente invención.

45 Los métodos de estimulación *ex vivo* de la presente invención tienen ventajas concretas. Por ejemplo: 1) la activación y el fortalecimiento es específico de las células CD4⁺ CD25⁺; 2) la estimulación en el cultivo a largo plazo permite la eliminación de los antígenos estimulantes antes de la reintroducción de las células en el hospedante; y 3) la falta de exposición *in vivo* sistémica a los antígenos activadores y fortalecidas impide la interferencia significativa con las respuestas inmunogénicas naturales. Asimismo, el éxito se logra con mínima toxicidad del hospedante, usando las técnicas de activación y fortalecimiento *ex vivo*, y la composición de las células supresoras se prepara completamente de acuerdo con las condiciones de GMP, lo que significa que las células CD4⁺ CD25⁺ *ex-vivo* fortalecidas en el cultivo pueden ser aprobadas rápidamente para infusión humana.

55 Para aplicación clínica, el producto celular debe lograr una cierta relación efector a diana *in vivo* con el fin de obtener el efecto beneficioso deseado. En muchos casos, las aportadas al comienzo del cultivo celular serán limitantes debido a la rareza de las células precursoras supresoras, o a las cantidades limitantes de material clínico. Los métodos provistos están diseñados para producir en el orden de 10⁹ células fortalecidas por cultivo para aplicaciones clínicas. Asimismo, con el fin de que el proceso del cultivo de tejido sea clínicamente relevante, debe ser ampliable a gran escala y cumplir con los procedimientos y reactivos aprobados de la FDA. Por consiguiente, los métodos de la presente invención, específicamente diseñados para cumplir con estos requerimientos, ventajosamente producen una infusión de células supresoras CD4⁺ CD25⁺ fortalecida que es lo suficientemente específica para superar

problemas asociados al volumen que haría que usar las células Treg naturales fuese imposible para lograr un efecto terapéutico inmunosupresor o preventivo en un paciente, y los métodos utilizan condiciones que han sido previamente aprobadas para tratamiento humano.

5 Las células expandidas en cultivo producidas por los métodos actuales de expansión en cultivo a largo plazo se pueden ver como un reactivo provisto por la presente invención para uso en el tratamiento de la GVHD, que comprende células CD4⁺ CD25⁺ activadas y fortalecidas (modificadas). Preferiblemente, las células T se suspenden en medio adecuado para administración intravenosa a un paciente humano de trasplante o con cáncer, tal como un medio que comprende disolución tamponada con fosfato. Si bien no se limita a ningún mecanismo, se cree que el cultivo a largo plazo de las células en el modo propuesto produce el enriquecimiento y la activación del subconjunto potente, creando de este modo una población suficiente de células para producir beneficios terapéuticos en el paciente.

10 Si bien no es parte de la invención reivindicada, también se contempla un método para inducir una respuesta anti-GVHD *in vivo*, que comprende contactar las células CD4⁺ CD25⁺ del hospedante con composiciones activadoras y/o fortalecedoras *ex vivo* e infundir así las células CD4⁺ CD25⁺ activadas y/o fortalecidas en el hospedante autólogo, que se ha sometido o se someterá a trasplante alogénico que podría producir o que ya ha iniciado la respuesta de GVHD en el receptor del trasplante. Las células son por lo general células hematopoyéticas, tales como linfocitos de sangre periférica, células del bazo, linfocitos infiltrantes de tumores o células de ganglios linfáticos.

15 Por lo tanto, aunque no es parte de la invención reivindicada, se contempla un método para tratamiento humano y que comprende: a) obtener células T reguladoras del paciente o de un donante alogénico; b) aislar una población de células CD4⁺ CD25⁺ de las células obtenidas, seguido de c) activar y fortalecer en cultivo a largo plazo las células CD4⁺ CD25⁺ cultivadas, en donde el método para fortalecer y activar en cultivo para crear células CD4⁺ CD25⁺ modificadas en un medio comprende la presencia de IL-2, IL-15 humana u otra interleucina o compuesto revelado para fortalecer la proliferación celular, aumentando así el número de células supresoras CD4⁺ CD25⁺ modificadas en el cultivo; y d) reintroducir por lo menos una porción de las células T supresoras CD4⁺ CD25⁺ modificadas en el paciente hospedante como para inducir una respuesta terapéutica *in vivo*. Dicha respuesta previene, bloquea, suprime, inhibe o revierte la GVHD u otra respuesta autoinmunitaria, o la proliferación de células de sangre periférica en un paciente con cáncer.

20 El método para el tratamiento humano puede utilizar las células CD4⁺ CD25⁺ fortalecidas en cultivo *ex vivo* a largo plazo, usando los métodos de cultivo que se dan a conocer en este documento. El método puede utilizar células Treg CD4⁺ CD25⁺ fortalecidas en cultivo a largo plazo *ex vivo* derivadas de médula ósea, usando los métodos de cultivo que se dan a conocer en este documento, excepto en este caso, los aspirados de médula ósea se usarían para adquirir la población de células Treg.

25 Los linfocitos utilizados en el primer aspecto de la presente invención se pueden obtener antes del inicio del cáncer, de hospedantes que no padecen cáncer, y conservarse usando técnicas convencionales hasta que sean necesarios al inicio de la enfermedad, momento en el cual las células pueden descongelarse, cultivarse y activarse, y reforzarse como se describió previamente en este documento para reinfusión en el hospedante. De manera alternativa, se puede preparar una línea celular establecida a partir de hospedantes libres de cáncer (alogénica o autóloga). La línea celular se puede conservar, activar y fortalecer en cultivo hasta que sea necesaria. De modo similar, los linfocitos pueden obtenerse antes del trasplante alogénico del receptor del trasplante, y conservarse usando técnicas convencionales hasta completar el trasplante, momento en el cual pueden descongelarse, despojarse de CD25⁺ y/o fortalecerse en cultivo y activarse como se describe en este documento para reinfusión en el hospedante a fin de bloquear, suprimir, inhibir o prevenir la GVHD, o revertir la GVHD, si ya se ha iniciado. Alternativamente, se puede preparar una línea celular establecida del hospedante antes del trasplante, y conservarse como se indicó antes, o se pueden despojar de las CD25⁺ y/o fortalecerse en cultivo y activarse como se describió previamente, hasta ser necesaria.

30 El método para tratamiento humano puede además comprender la etapa de administrar IL-2, IL-15 humana u otro agente descrito al paciente hospedante *in vivo* después de re-introducir las células CD4⁺ CD25⁺ modificadas. Las células modificadas *ex vivo* reintroducidas en forma autóloga se consideran por lo tanto un implante celular. Alternativamente, el hospedante es tratado de modo similar después de que las células donantes CD4⁺ CD25⁺ modificadas se introducen en forma alogénica en el receptor.

35 Los objetos, ventajas y características novedosas adicionales de la invención se exponen en parte en la descripción, los ejemplos y las figuras que siguen, destinados a fines ilustrativos solamente y no limitativos de la invención en modo alguno, y en parte serán obvios para el experto en la técnica al examinar lo siguiente, o se podrán aprender mediante la práctica de la invención.

55 **Breve descripción de los dibujos**

El compendio anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se entenderán mejor cuando se lean conjuntamente con los dibujos adjuntos. Debe entenderse, no obstante, que la invención no está limitada a las disposiciones e instrumentalidades precisas mostradas.

La FIG.1 exhibe gráficamente la frecuencia (%) de los linfocitos CD4⁺ CD25⁺ presentes en células CD4⁺ totales aisladas de muestras de tumores cancerosos de pulmón en comparación con linfocitos de sangre periférica (PBL) de pacientes con cáncer de pulmón según lo determinado por citometría de flujo. Se muestran distribuciones y medias: PBL de donantes normales , n=7 [izquierda]; linfocitos infiltrantes de tumores sin estimulación (TIL) de pacientes con NSCLC, n=8 [centro];

o PBL sin estimulación de pacientes con NSCLC, n=9 [derecha]. los valores P se calcularon usando la prueba T de Student de 2 colas.

Las fig. 2A-2B demuestran en forma gráfica el aumento en la expresión de CTLA-4 hallado en células CD4⁺CD25⁺ infiltrantes de tumores. La FIG. 2A es un histograma de flujo de 2 pacientes representativos que demuestran la expresión de CTLA-4 en TIL y PBMC de CD4⁺CD25⁻ y CD4⁺CD25⁺. La FIG. 2B demuestra el porcentaje de la media (\pm S.E.) de células que expresan CTLA-4 en linfocitos infiltrantes de tumores CD4⁺CD25⁻ (izquierda), linfocitos infiltrantes de tumores CD4⁺CD25⁺ (centro) y células mononucleares de sangre periférica CD4⁺CD25⁺ (PBMC) (derecha) de 5 pacientes con NSCLC consecutivos.

Las fig. 3A-3B demuestran gráficamente la inhibición directa de proliferación de células T anti-CD3 o anti-CD3/CD28 autólogas inducida por células CD4⁺CD25⁺ infiltrantes de tumores. Los PBL autólogos se cultivaron solos o con cantidades en aumento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) CD4⁺CD25⁺ o CD4⁺CD25⁻ clasificados por purificación de muestras de cáncer de pulmón, y las células se estimularon con anti-CD3 (FIG. 3A) soluble o unido a la placa (FIG. 3A) o con anti-CD3/CD28 inmovilizado en plástico (FIG. 3B) y se midió la incorporación de [³H]timidina. Los resultados se expresan como % de respuesta de PBL cultivados solos; 100% de proliferación para el gráfico CD25⁻ = 37081 \pm 4094 cpm, y para el gráfico CD25⁺ = 29465 \pm 1007 cpm.

Las fig. 4A-4D muestran que las células CD4⁺CD25⁺ infiltrantes de tumores no pudieron suprimir las células T de donantes normales alogénicos o de pacientes con cáncer de pulmón. Las células T periféricas alogénicas de donantes normales (FIG 4A) o los PBL autólogos de un paciente con NSCLC (FIG 4B) se cultivaron con las cantidades indicadas de células CD4⁺CD25⁺ infiltrantes de tumores de pacientes con cáncer. En la FIG. 4C, las células T de sangre periférica de un donante normal se cultivaron con células T CD4⁺CD25⁺ de sangre periférica purificadas por clasificación autólogas. En la FIG. 4D, las células CD4⁺CD25⁺ o CD4⁺CD25⁻ infiltrantes de tumores se cultivaron con PBL alogénicos de un paciente con NSCLC. Todos los cultivos celulares se estimularon con anti-CD3/CD28 unido a la placa, y se midió la incorporación de [³H]timidina. Los resultados se expresan como la media de cultivos triplicados (\pm S.E.) para uno de tres (FIG. 4A), dos (FIG 4B), dos (FIG. 4C) o cuatro (FIG. 4D) experimentos independientes, cada uno con resultados similares.

Las fig. 5A y 5B demuestran que la segregación de TGF- β constitutiva por células CD4⁺CD25⁺ infiltrantes de tumores no es necesaria para la inhibición de la proliferación de PBL autólogos. La FIG. 5A es un ELISA de los sobrenadantes de cultivos de células CD4⁺CD25⁺ y de CD3⁺ despojadas de células CD4⁺CD25⁺ de pacientes con cáncer de pulmón ensayados para TGF- β . Los resultados son representativos de 1 de 6 pacientes (\pm S.E para pocillos triplicados). En la FIG. 5B, se cultivaron PBL autólogos solos o con cantidades variables de células CD4⁺CD25⁺ y se estimularon con anti-CD3/CD28 unido a la placa. Se añadió anticuerpo neutralizador anti-TGF- β y se midió la [³H]timidina. Los resultados se expresan como la media de los cultivos triplicados (\pm S.E.) para uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

Las fig. 6A y 6B muestran en forma gráfica que la reducción de células CD4⁺CD25⁺ acelera la letalidad de la GVHD. Las células T CD4⁺ B6 enteras con reducción de CD4⁺ o CD25 se transfirieron a recipientes bm12 irradiados en forma subletal (en la FIG 6A, se administraron 1x10⁵ células por animal; En la FIG. 6B, se administraron 5x10⁴ células por animal). eje x = días después de la transferencia de las células; eje y = proporción de receptores sobrevivientes. n = 8/grupo FIG. 6A, p = 0,024; FIG. 6B, p = 0,0068.

La FIG. 7 demuestra gráficamente que la reducción de células CD4⁺CD25⁺ acelera la letalidad por GVHD en una combinación de cepas diferente. Los ratones BALB/c se trasplantaron con B6 BM y o bien células T CD4⁺ enteras o células T CD4 o con células T CD4 despojadas de CD25 (CD25) , eje x = días después del trasplante . eje y = proporción de receptores . n = 8/grupo; p = 0,016.

La FIG. 8 demuestra gráficamente que la disminución del número de células CD25⁺ de un inóculo de células T enteras acelera la GVHD en un modelo de GVHD de SCID no irradiado. Las células T B6 enteras o despojadas de CD25 se infundieron en ratones BALB/c no irradiados a los que previamente se les redujo el número de NK con anti-asialo GM1. eje x = días después de la transferencia de las células. eje y = proporción de receptores sobrevivientes. n = 4/grupo; p = 0,021.

La FIG. 9 demuestra gráficamente que la reducción del número de células CD25⁺ de bazo entero provoca una aceleración de la mortalidad por GVHD. Ratones letalmente irradiados B10.BR se trasplantaron con B6 BM y o bien 15 x 10⁶ bazo entero o bazo con reducción del número de CD25. eje x = días después de la transferencia de las células. eje y = proporción de receptores sobrevivientes. n = 8/grupo; p = 0,055.

La FIG. 10 demuestra gráficamente que la reducción pre-trasplante *in vivo* del número de células CD25⁺ acelera la GVHD. Ratones B6 timectomizados tratados con (mAb) de anticuerpo monoclonal anti-CD25 o tratados con mAb

control se irradiaron letalmente y se trasplantaron con BM de BALB/c y 15×10^6 células de bazo. Se administró anti-CD25 mAb en los días -10, -7 y -4 en relación al día del trasplante. eje x = días después de la transferencia de las células. eje y = proporción de receptores sobrevivientes. n = 8/grupo; p = 0,0063.

- 5 La FIG. 11 muestra gráficamente que las células CD25⁺ expandidas y activadas *ex vivo* inhiben la GVHD. Se infundieron células T vírgenes CD4⁺ de B6 en receptores BALB/cSCID no irradiados despojados de NK. Las cohortes de ratones recibieron una inyección separada de células CD4⁺CD25⁺ o células CD4⁺CD25⁻ activadas. Las células se activaron y expandieron por anti-CD3 mAb inmovilizado y IL-2 en alta dosis. eje x = días después de la transferencia de las células. eje y = proporción de receptores sobrevivientes. n = 8/grupo; p = 0,022 para CD4⁺ frente a CD4⁺ + CD25⁺.
- 10 La FIG. 12 demuestra gráficamente que las células CD25⁺ cultivadas bajo diferentes condiciones inhiben la GVHD. Las células T de B6 despojadas de CD25 (CD25⁻) se infundieron en receptores BALB/c SCID no irradiados y despojados de NK. Un segundo grupo de ratones recibió una inyección separada de células CD25⁺ expandidas como en la FIG. 11, con anti-CD3 mAb inmovilizado y alta dosis de IL-2 (recuadros abiertos). Un tercer grupo recibió una inyección separada de células CD25⁺ cultivadas con esplenocitos de BALB/c irradiados y alta dosis de IL-2 (triángulos abiertos). Un cuarto grupo recibió una inyección separada de células CD25⁺ cultivadas con esplenocitos de BALB/c irradiados y baja dosis de IL-2 y TGF- β (asterisco). eje x = días después de la transferencia de las células. eje y = proporción de receptores sobrevivientes. n = 6/grupo; todos los valores p \leq 0,016 comparados con el grupo control (círculo cerrado).
- 20 La FIG. 13 muestra gráficamente que las infusiones múltiples de células CD4⁺CD25⁺ activadas y expandidas suprimen la mortalidad de la GVHD en receptores letalmente irradiados de injertos de donantes de distinto MHC totales.
- La FIG. 14 muestra gráficamente que después del inicio de la GVHD, una sola infusión de células CD4⁺CD25⁺ activadas y expandidas rescató a 40% de los receptores letalmente irradiados de la mortalidad por GVHD a largo plazo (por un periodo por lo menos 3 veces más prolongado que el grupo control).
- 25 Las fig. 15A-15D representan la purificación de células CD4⁺CD25⁺ de sangre periférica usando gráficos FACS de 2 colores representativos de PBMC y células CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ purificadas. La FIG. 15A muestra los resultados de un examen de sangre periférica que revela que las células CD4⁺CD25⁺ constituyen 1-3% de las PBMC. Hay un número variable de células no -CD4⁺ que expresan CD25, en general con expresión de menor intensidad (principalmente células B). La FIG. 15B muestra que algunos donantes evidencian una población de CD4⁺CD25⁺ más distintiva. La FIG. 15C muestra células CD4⁺CD25⁺, purificadas con microesferas escindibles anti-CD25-FITC y anti-FITC, y posteriormente con disminución del número de linaje. La intensidad de la tinción CD25-PE se reduce ligeramente por la tinción con anti-CD25-FITC. La FIG. 15D muestra células CD4⁺CD25⁻, purificadas por reducción del número de CD25 de PBMC, seguidas por selección positiva CD4⁺. Los datos son representativos de 20 evaluaciones de donantes, y 10 experimentos de purificación celular.
- 30
- 35 Las fig. 16A-16C representan gráficamente la expansión de líneas celulares supresoras de CD4⁺CD25⁺ en términos de proliferación de células CD4⁺CD25⁺ en ensayos a corto plazo, y la acumulación en cultivos a largo plazo. La FIG. 16A muestra la proliferación de células CD4⁺CD25⁻ altamente purificadas (Δ) y células CD4⁺CD25⁺ negativas de linaje de doble columna (\blacksquare), en ensayos de incorporación de ³H-Timidina de 96 pocillos a corto plazo. Las células CD4⁺CD25⁻ proliferan notablemente, mientras que las células CD4⁺CD25⁺ solamente proliferan en forma mínima y transitoria. La FIG. 16B muestra el aumento de la proliferación de células CD4⁺CD25⁻ negativas de linaje de doble columna altamente purificadas (\blacksquare), en ensayos de incorporación de ³H-Timidina en 96 pocillos a corto plazo. La IL-2 a 100 IU/ml aumenta la expansión (\blacklozenge). Sin embargo, el enriquecimiento de células alimentadoras CD4⁺CD25⁻ irradiadas (relación 1:1) (\bullet), proporciona un aumento de la expansión que es más sostenido. Representativo de 4 experimentos. La FIG. 16C muestra la acumulación en cultivo a largo plazo de líneas celulares CD4⁺CD25⁺. Las líneas celulares estimuladas una vez con esferas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 mAb (\square), o con anti-CD3 inmovilizado (\blacksquare), se enriquecieron ambas con células alimentadoras. Las células se dividieron y se alimentó IL2 cada 3-4 días conforme era necesario. Los datos se presentan como expansión múltiplo del número de células, y son representativos de 22 cultivos para esferas recubiertas con anti-CD3/CD28 mAb y 3 cultivos para anti-CD3 mAb inmovilizado con plástico.
- 40
- 45
- 50 Las fig. 17A-17C representan células CD4⁺CD25⁺ cultivadas purificadas que suprimen notablemente la MLR. Los cultivos de MLR contienen diversas poblaciones de células de ensayo en una relación supresora/respondedora (1:2). Se muestran curvas cinéticas de proliferación a lo largo de una MLR de una semana. Los cultivos se pulsaron diariamente con (³H)-Timidina durante las últimas 16 horas de cultivo. La FIG. 17A muestra líneas celulares representativas derivadas de células CD4⁺CD25⁺ (purificación por reducción de linaje de doble columna) que son buenas supresoras (\bullet). En contraste, las líneas celulares derivadas de células CD25⁻ (Δ) aumentan la MLR, frente a cultivos de MLR control (\square). Los resultados son representativos de 22 experimentos. La FIG. 17B muestra células CD4⁺CD25⁺ purificadas con MACS estándar (\blacklozenge), añadidas a MLR, en comparación con líneas celulares CD4⁺CD25⁺ representativas débilmente supresoras (\bullet), frente a MLR control (\square). Los resultados son representativos de 4 experimentos. La FIG. 17C muestra que una reacción de MLR fue prácticamente bloqueada por completo por
- 55

adición de células CD4⁺CD25⁺ cultivadas potentemente supresoras (●), frente a MLR control (□). Representativo de 7 líneas celulares supresoras potentes, ensayadas en 14 MLR.

La FIG. 18A-18K presenta comparaciones por citometría de flujo de líneas celulares CD25⁺ frente a CD25⁻ después de 3-4 semanas de expansión en cultivo. La expresión de antígenos se perfiló mediante análisis FACS. Se muestran gráficos representativos de líneas celulares derivadas de CD25⁻, en comparación con líneas celulares supresoras potentes, y líneas celulares débilmente supresoras. (FIG. 18A-18C). La FIG. 18A muestra que las líneas celulares derivadas de células CD25⁻ expresan bajos niveles de CD25, ya que se revierten a un estado más quiescente. La FIG. 18B muestra que las líneas celulares supresoras potentes mantienen altos niveles de expresión de CD25. La FIG. 18C muestra que las líneas celulares derivadas de células CD4⁺CD25⁺ que tienen función supresora débil expresan niveles intermedios de CD25. (FIG. 18D-18F). La FIG. 18D muestra que las líneas celulares derivadas de CD4⁺CD25⁻ expresan CTLA4 intracelular mínimo. La FIG. 18E muestra que las líneas celulares supresoras potentes mantienen altos niveles de expresión intracelular de CTLA4. La FIG. 18F muestra que las líneas celulares débiles expresan niveles intermedios. (FIG. 18G-18I). La FIG. 18G muestra que las líneas celulares derivadas de CD25⁻ expresan niveles variables de CD62L y disminución de CD27. La FIG. 18H muestra que las líneas celulares supresoras contienen un porcentaje mayor de células que expresan tanto CD62L como CD27. La FIG. 18I muestra que las líneas celulares supresoras débiles contienen un porcentaje menor de células que expresan tanto CD62L como CD27. Las fig. 18J-18K muestran que la clasificación celular de subconjuntos de líneas supresoras revela células supresoras potentes para expresar CD62L y CD27. La FIG. 18J es un gráfico del análisis FACS que muestra puertas de clasificación de subconjuntos para CD62L y CD27. La FIG. 18K presenta un análisis funcional en la MLR, que revela actividad supresora exclusivamente dentro del subconjunto positivo doble de CD62L y CD27 (barra a rayas). Cultivos de MLR control (barra gris) y MLR suprimido (barra oscura). Como se muestra, el subconjunto CD62L⁺/CD27⁺ (barra de bloques), y el subconjunto CD62L⁻/CD27⁻ (barra ondeada) aumentan ambos la MLR.

Las fig. 19A-19D representan gráficamente que las células CD4⁺CD25⁺ cultivadas suprimen continua y notablemente la proliferación de MLR y la segregación de citocinas. Las líneas celulares supresoras CD25⁺ potentes se ensayaron en MLR múltiples de diversos donantes no relacionados. La FIG. 19A muestra 8 MLR separadas que exhiben varianza de control y proliferación suprimida. En la mayoría de las combinaciones de donantes, la MLR estuvo notablemente obstaculizada. Cultivos de MLR control (barras grises) y MLR suprimida (barras oscuras). Los resultados son representativos de más de 20 experimentos con 7 líneas celulares supresoras potentes distintas. La FIG. 19B muestra el efecto cuando se sumaron números escalonados de células supresoras cultivadas potentes a la reacción de MLR para determinar el número mínimo necesario para inhibición. Hasta una dilución 1:16 (aproximadamente 3.125 supresoras), MLR aún notablemente obstaculizada, cuando se usan las más potentes de las líneas celulares supresoras. Se exponen tres gráficos, representativos de 6 líneas celulares supresoras potentes. La FIG. 19C presenta una evaluación diaria de los niveles de IL-2 en sobrenadante de cultivo, revelando un bloqueo profundo en la acumulación de IL2 en cultivos de MLR con supresión (●), frente a cultivos de MLR control (□). Representativo de 4 análisis de MLR. La FIG. 19D presenta una evaluación de otras citocinas producidas por células T activadas, revelando una profunda deficiencia de acumulación. No se producen niveles significativos de TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-6 o IL-10. Se muestran los niveles del día 6, pico de acumulación en cultivos MLR control (barras claras), frente a cultivos de MLR suprimida (barras oscuras). Representativo de 4 análisis de MLR.

Las FIG. 20A-20G muestran que las células Treg cultivadas impiden la activación de células T respondedoras, y pueden suprimir la MLR, impulsada por DC maduras. Se evaluaron las MLR para expresión de antígenos de activación después de un día de cultivo. Se muestran las MLR control teñidas para CD69 en la FIG. 20A, CD25 en la FIG. 20B y OX40 (CD134) en la FIG. 20C. En las MLR, las células T respondedoras suprimidas se seleccionaron primero en HLA-A2 para distinguirlas de las células supresoras negativas HLA-A2. Por separado se muestran las células respondedoras de MLR suprimida teñidas para CD69 en la FIG. 20D, CD25 en la FIG. 20E y OX40 (CD134) en la FIG. 20F. Los resultados son representativos de 3 experimentos. La FIG. 20G muestra la maduración de DC, antes de la MLR, por LPS o combinación de TNF/polyIC, o que la inclusión de estos factores estimulantes en la MLR no puede eludir la supresión. Cultivos de MLR control (barras grises) y MLR suprimida (barras oscuras).

La FIG. 21A-21D representa gráficamente los resultados de un análisis funcional de supresión en MLR. La FIG. 21A muestra que las líneas celulares supresoras carecen de citotoxicidad significativa para DC en ensayos de liberación de cromo (●). Lisis de control mediada por la línea celular de NK, NK92 (□). La FIG. 21B muestra que las líneas celulares supresoras carecen de actividad de linfocitos citolíticos naturales (NK) o de actividad del tipo exterminadora activada por linfocinas (LAK) y no exhiben actividad lítica contra K562 en ensayos de liberación de cromo (●). Lisis control mediada por la línea celular de NK, NK92 (□). Se utilizaron 5.000 dianas rotuladas en ambas FIG. 21A y 21B, con una relación hasta 20:1 efector/diana en cada una. La FIG. 21C muestra en ensayos de MLR que el uso de anticuerpos neutralizantes hacia factores inmunosupresores IL-10 y hacia TGF- β , como también anti-IL-10R, o combinaciones de los tres, no pudo revertir la supresión mediada por las líneas celulares supresoras cultivadas. La FIG. 21D muestra que las líneas celulares supresoras potentes tienen actividad inhibitoria mínima añadida a la MLR promovida por las DC que son autólogas para la supresora (y alogénicas para la respondedora). La línea celular supresora Ts-A (barras reticuladas) se usó para suprimir cultivos MLR promovidos por DC-A (del mismo donante que la supresora) o por DC-B (de un donante distinto de la supresora). Línea celular supresora Ts-B (barras a cuadros), también se ensayó contra DC-A y DC-B. Representativo de 4 experimentos.

Descripción de las realizaciones preferentes de la invención

Se halló que las muestras de tumores pulmonares primarios de pacientes con cáncer de pulmón incipiente alojan grandes cantidades de células T con el fenotipo previamente atribuido a las células T reguladoras ("células Treg"). En contraste a las descripciones previas de células T reguladoras, los linfocitos CD4⁺ CD25⁺ en tumores poseen expresión superficial sorprendentemente alta de CTLA-4, e inhiben directamente la proliferación de células T autólogas, pero no alogénicas. Este efecto supresor de las células T CD4⁺ CD25⁺ residentes en el tumor fue potente y ocurrió incluso después de la activación vigorosa de las células T respondedoras, estableciendo una fuerte correlación entre las células Treg y la supresión de la activación y la respuesta de células citotóxicas.

Tal como se emplea en este documento, "células alogénicas" (alogenicidad) son aquellas aisladas de un individuo (el donante) e infundidas en otro (el receptor u hospedante); mientras que "células autólogas" (autología) hace referencia a aquellas células que se aíslan y se vuelven a infundir en el mismo individuo (receptor u hospedante). Por consiguiente, la proliferación de células T alogénicas es estimulada por células presentadoras de antígenos ("APC") de otro individuo, mientras que la proliferación de células T autólogas es estimulada por auto-APC. A menos que se especifique, las APC de la presente invención pueden, por lo tanto, ser de cualquier tipo conocido en la técnica.

"Antígenos" son entidades que inician las respuestas inmunitarias. "Aloantígenos" hace referencia a agentes que causan que el sistema inmunitario de un individuo reconozca y destruya las células de otro individuo cuando los dos se combinan entre sí. "Mitógenos" son agentes que inducen a todas las células T a proliferarse en un modo no específico de antígenos.

"Reacción linfocitaria mixta", "cultivo de linfocitos mixtos", "MLR" y "MLC" se usan de manera indistinta para hacer referencia a una mezcla que comprende un mínimo de dos poblaciones celulares diferentes que son alotípicamente diferentes. Por lo menos una de las células alotípicamente diferentes es un linfocito. Las células se cultivan juntas por un tiempo y bajo condiciones adecuadas que resultan en la estimulación de los linfocitos, que en esta invención particular son células Treg. Un objetivo frecuente de una MLC consiste en proveer estimulación alogénica, tal como puede ser iniciar la proliferación de las células T; pero a menos que se indique, la proliferación durante el cultivo no se requiere. En el contexto correcto, estos términos pueden hacer referencia alternativamente a una mezcla de células derivadas de dicho cultivo. Cuando las células de una MLC se administran como un bolo a un ser humano, se denominan "implante celular".

Si bien las células reguladoras inmunitarias CD4⁺ CD25⁺ son reguladores importantes de homeostasis *in vivo* y se requieren para la prevención de la autoinmunidad, el rol de estas células supresoras profesionales en las alorrespuestas no se ha estudiado tan bien. En función de estos hallazgos de que las células Treg suprimen la activación de células T citotóxicas, una realización preferida de la presente invención realmente utiliza las células supresoras profesionales para regular las respuestas de las células T a aloantígenos y para investigar la generación de la enfermedad injerto contra hospedante (GVHD). Esto se demuestra por la aceleración de GVHD y/o por el incremento en la letalidad que ocurrió en los resultados provistos, en donde las células CD25⁺ fueron despojadas *ex vivo* del inóculo de células T o el receptor se acondicionó *in vivo* por la administración pre-trasplante de una infusión de anticuerpo monoclonal anti-CD25 (mAb). La extracción de células CD25⁺ resultó en un incremento en GVHD independientemente de si las respuestas antihospedantes del donante fueron mediadas por células T CD4⁺ o por células T CD4⁺ y CD8⁺.

Esto coincide con los datos de otros (*p. ej.*, Piccirillo et al., J. Immunol. 167:1137-1140 (2001); Gao et al., Transplantation 68:1891-1897 (1999)). Además, se halló que la reducción del número de células CD25⁺ acelera la GVHD en varias combinaciones de cepas, independientemente de la intensidad del acondicionamiento, indicando que incluso en un entorno de citocinas altamente proinflamatorias, las células CD25⁺ estaban funcionando como supresoras de alorrespuestas. Por lo tanto, los datos de la disminución del número aquí provistos indicaron la función de las células CD25⁺ en la inhibición de alorrespuestas, y demostraron que la infusión de células CD25⁺ podría prevenir o aliviar la GVHD, mientras que los datos previos indicaron que las células CD4⁺ CD25⁺ nuevas vírgenes no mediaron la letalidad de la GVHD sola y tuvieron solamente un efecto protector modesto cuando se infundieron con células T inductoras de GVHD en una relación 1:1 (Taylor et al., 2001).

Si bien hay dos poblaciones de células positivas CD25, las células CD25⁺ en general constituyen 5-10% de la población de células T CD4⁺ total en todas las células de sangre periférica humana (PBMC). No obstante, solamente 1-2% de las células CD25⁺ expresan niveles muy altos de CD25, y se cree que son las células Treg auténticas, o como mínimo Treg con función fortalecida. Como consecuencia, sería difícil infundir suficientes cantidades de células reguladoras purificadas para que tengan un beneficio terapéutico importante.

Los datos de Thornton y Shevach, que usan APC acopladas con anti-CD3 e IL-2 para activar las células Treg, indicaron que en los ratones, las células CD4⁺ CD25⁺ podrían ser células supresoras más potentes tras la activación *ex vivo* (Thornton et al., J. Immunol. 164:183-190 (2000)). Desafortunadamente, la infusión de Thornton no ofrece beneficios terapéuticos para seres humanos, ya que el método no sería aprobable para la FDA, ni describió ningún modo para expandir las células. Como se indicó previamente, el desarrollo de células T de ratón es significativamente diferente de los requerimientos de desarrollo de células T humanas (véase Mestas, J. Immunol.

172: 2731 (2004)). Asimismo, si bien los mAb anti-CD40L (CD154) o anti-B7 (anti-CD80 y CD86) bloquearon completamente una respuesta *in vitro*, no previnieron eficazmente la GVHD *in vivo*.

5 Cabe destacar que un método anterior altamente eficaz utilizaba esferas anti-CD3/28 (Takahashi et al., Int. Immunol. 10:1969-80 (1998)), pero Takahashi describe que la inclusión de mAb anti-CD28 soluble con mAb anti-CD3 bloquea la supresión. Se ha demostrado que las células CD4⁺ CD25⁺ no son sensibles a múltiples estímulos *in vitro*, excepto anti-CD3+IL-2. Sin embargo, las células no sensibles que se someten a expansión vigorosa se vuelven sensibles.

10 Por consiguiente, la bibliografía sugiere que la expansión robusta ocurriría a expensas de la retención de actividad celular supresora, y solamente se describieron bajos niveles de expansión. Por lo tanto, no se habría pronosticado en la técnica anterior que los métodos actuales fuesen capaces de expandir las células CD4⁺CD25⁺ sin pérdida de actividad supresora, y no se habría pronosticado que provean expansión tan robusta como se muestra en la presente invención con un incremento de la función celular supresora.

15 No obstante, al reconocer la necesidad de un método terapéutico eficaz para tratar a pacientes para suprimir y prevenir la GVHD, la presente invención utiliza un sistema de cultivo que cumple con la GMP, tanto para activar como para expandir las células Treg. Una realización preferida de la presente invención usa esferas recubiertas de mAb anti-CD3/28 en combinación con IL-2 y células alimentadoras irradiadas para inducir expansión robusta (i) en >100 veces y (ii) un incremento en la actividad de las células supresoras. A su vez, las tasas de expansión robusta descritas en este documento están asociadas con actividad celular supresora más potente que la previamente descrita en la bibliografía (véase Godfrey et al., Blood in press 2004, publicación electrónica en línea, 18 de marzo de 2004).

20 Una "línea celular" o "cultivo celular" representa células eucariotas superiores desarrolladas o mantenidas *in vitro*. Se entiende que los descendientes de una célula pueden no ser completamente idénticos (ya sea morfológica, genotípica o fenotípicamente) a la célula madre. Los estudios iniciales en modelos de ratones de trasplante de célula ósea (BMT) han demostrado que las células CD4⁺CD25⁺ pueden prevenir la GVHD en barreras de histocompatibilidad mayor (MHC) (Taylor et al., Blood 99(10):3493-3499 (2002), Hoffman et al., J. Exp. Med. 196(3):389-399 (2002), Cohen et al., J. Exp. Med. 196(3):401-406 (2002)). No obstante, las presentes realizaciones demuestran que las células CD4⁺CD25⁺ pueden expandirse hasta un grado incluso mayor con duración de cultivo más prolongada ("largo plazo") que lo que era posible anteriormente. Por lo tanto, las realizaciones preferidas de la presente invención describen células Treg o células CD4⁺CD25⁺ o CD25⁺ "expandidas en cultivo a largo plazo".

30 Por "largo plazo" se entiende un periodo de cultivo que dura más de 1 semana, preferiblemente ≥ 10 días, más preferiblemente ≥ 2 semanas, más preferiblemente $\geq 3-4$ semanas, más preferiblemente ≥ 1 mes, más preferiblemente $\geq 6-8$ semanas, más preferiblemente ≥ 2 meses, más preferiblemente ≥ 3 meses, más preferiblemente ≥ 6 meses y lo más preferiblemente 1 año o más - siempre que se retenga algún nivel de funcionamiento celular, específicamente actividad supresora. Por consiguiente, los datos exhibidos en la presente invención indican que, si bien los distintos protocolos de activación *ex vivo* llevaron a recuperaciones variables o expansión de células CD4⁺CD25⁺, todos los protocolos produjeron células que suprimieron significativamente o inhibieron la GVHD.

40 Los protocolos de activación *ex vivo* investigados en estos estudios están destinados al médico, y a dar a conocer datos de la eficacia del principio. Los protocolos provistos jamás tuvieron como fin, no obstante, ser una lista exhaustiva de estrategias potenciales de expansión y activación, ya que ya hay muchos métodos conocidos para tratar sangre *ex vivo* que podrían aplicarse, p. ej., aquellos empleados en las patentes de Estados Unidos núm. 6.251.385; 6.203.787; 6.051.227; 5.962.318; 5.728.388; 5.472.867; 5.399.493, si bien se siguen descubriendo nuevos métodos que permitirán avances a los principios aquí descritos.

45 Tal como se emplea en este documento, "tratamiento" o "terapia" hace referencia a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula que se esté tratando, y puede realizarse o bien para profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables incluyen, aunque sin limitarse a ello, prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, aliviar los síntomas, suprimir, disminuir o inhibir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir las metástasis, reducir la tasa de progresión de la enfermedad, reducir o paliar la enfermedad y provocar la remisión o un mejor pronóstico. La "patología" asociada con un estado de enfermedad es cualquiera que comprometa el bienestar, la fisiología normal o la calidad de vida del individuo afectado. Esto también puede comprender (de manera no taxativa) la invasión destructiva de tejidos afectados en áreas previamente no afectadas, desarrollo a costa del funcionamiento del tejido normal, actividad biológica irregular o suprimida, agravamiento o supresión de una respuesta inflamatoria o inmunológica, aumento de la susceptibilidad a otros organismos o agentes patogénicos y síntomas clínicos indeseables tales como dolor, fiebre, náuseas, fatiga, alteraciones del estado de ánimo y otras características que pueden ser determinadas por el médico a cargo.

55 Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para producir un resultado clínico beneficioso o deseado, particularmente la generación de una respuesta inmunitaria, o la mejoría notable en el cuadro clínico. Una "cantidad inmunogénica" es una cantidad demostrada en el grupo de sujetos que se está tratando o ensayando (o bien con la enfermedad o no) suficiente para producir una respuesta inmunológica, que puede comprender o bien una respuesta

humoral, una respuesta celular o ambas. Preferiblemente de acuerdo con la presente invención, la supresión se logra en >30% sobre aquella que ocurriría en la práctica ausente de los métodos de expansión en cultivo que se describen en este documento. Más preferiblemente, la supresión lograda es ≥40%, más preferiblemente ≥ 50%, más preferiblemente ≥ 70%, más preferiblemente >85%, más preferiblemente ≥90%, más preferiblemente ≥ 95%, más preferiblemente ≥ 99, y lo más preferiblemente ≥100%, siempre que el cultivo *ex vivo* de las células sea sostenible a largo plazo.

Los términos "supresión", "inhibición" y "prevención" se usan en este documento de acuerdo con las definiciones aceptadas, es decir, la "supresión" se produce cuando una respuesta inmunitaria continua es bloqueada o se reduce significativamente en comparación con el nivel de respuesta inmunitaria que resulta de la ausencia de tratamiento mediante la presente invención. De modo similar, "inhibición" se refiere a bloquear la aparición de una respuesta inmunitaria o a reducir significativamente dicha respuesta en comparación con el nivel de respuesta inmunitaria que resulta de la ausencia de tratamiento por la presente invención. Cuando se administra en forma profiláctica, dicho bloqueo puede completarse de manera tal de que no ocurra una respuesta inmunitaria dirigida, típicamente denominada "prevención" con respecto a bloquear completamente la respuesta inmunitaria antes del inicio; o en la presente invención, el tratamiento puede ventajosamente reducir el efecto en comparación con el estado no tratado normal, típicamente denominado supresión o inhibición.

En términos de respuesta clínica para sujetos que portan una enfermedad neoplásica, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para paliar, reducir, estabilizar, revertir o demorar la progresión de la enfermedad, o de otro modo reducir las consecuencias patológicas de la enfermedad. De modo similar, en pacientes trasplantados que experimentan el inicio de la GVHD, o en aquellos susceptibles a GVHD, una cantidad eficaz es aquella que es suficiente para bloquear o prevenir su inicio; o si la patología de la GVHD ha comenzado, para paliar, reducir, estabilizar, revertir o demorar la progresión de la enfermedad, o de otro modo reducir las consecuencias patológicas de la enfermedad. En cualquier caso, una cantidad eficaz puede administrarse en una dosis única o en dosis divididas. Las cantidades preferidas y las relaciones celulares para uso en una cantidad eficaz se exponen en otra parte de esta descripción.

Ya que las células reguladoras inmunitarias CD4⁺CD25⁺ son una población muy heterogénea, parece probable que los distintos métodos de activación y expansión puedan resultar en poblaciones diferentes de células con función supresora/efectora potencialmente distinta. La heterogeneidad de las células reguladoras inmunitarias CD4⁺CD25⁺ todavía está siendo dilucidada. Actualmente, pueden subdividirse en dos clases principales: Adaptativa y natural. Estos tipos de células han sido definidos por Bluestone *et al.*, 2003, *supra*, y se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1)

Tabla 1. Una comparación de células reguladoras naturales y adaptativas.

Característica	Células Treg naturales	Células Treg adaptativas
Sitio de inducción	timo	Periferia
Dependiente de CD28-CD80/CD66	sí	No
Dependiente de IL-2	sí	Sí
Expresión de CD25	sí (alta)	Variable
Especificidad	autoantígenos en timo	Antígenos específicos del tejido y antígenos extraños
Mecanismo de supresión de células efectoras	contacto células T-células T/APC; dependiente de citocinas	contacto células T-células T/APC; dependiente de citocinas

Por ejemplo, algunos tipos de células T reguladoras dependen del TGF-β exógeno o de una combinación de IL-10 y TGF-β para la propagación y generación de actividad celular supresora, mientras que las poblaciones de células de la presente invención no dependen de dichos factores de crecimiento exógenos. Esto señala otra diferencia entre las células CD4⁺CD25⁺ humanas y el modelo animal (murino). Las células de ratón producen menos TGF-β que aquel producido por las células Treg humanas, como lo demuestran los estudios en IL-10. Esto añade algo no reportado para la variable en los hallazgos descritos que resultan del uso de células murinas cultivadas, ya que los lotes de suero de ternero fetal, etc contienen diversos niveles de TGF-β.

Debido a que las esferas anti-CD3/28 + IL-2 parecen expandir todas las subpoblaciones CD4⁺CD25⁺, una ventaja de la presente invención es que las células CD4⁺CD25⁺ pueden expandirse de la población heterogénea o subconjuntos de las células CD4⁺CD25⁺ con función más potente. Tal ha sido el caso de las células CD4⁺CD25⁺ que expresan altos niveles de L-selectina, un receptor de direccionamiento, que recientemente se descubrió que es un supresor más potente de GVHD que el subconjunto que expresa bajos niveles de L-selectina (CD62L) (véanse los ejemplos que siguen).

Cultivo y fortalecimiento de células $CD4^+CD25^+$ humanas. El medio inicial para generar cultivos de células supresoras incluyó anti-CD3 inmovilizado más IL-2 y TGF- β para cultivo (véase, p. ej., Kung et al., Science 206(4416):347-349 con respecto al clon de anticuerpo CD3, OKT3). Las células se desarrollaron en placas de plástico que contenían anti-CD3 pre-inmovilizado en la placa en diversas concentraciones, en donde 1-5 $\mu\text{g/ml}$ (concentración de inmovilización) es lo óptimo. Anteriormente, como se describe en los Ejemplos que siguen, era obvio para los inventores que el TGF- β no era necesario para el funcionamiento (FIG. 5), pero que parecía aumentar levemente la capacidad supresora. A medida que se modifican las condiciones, la necesidad/el beneficio para el TGF- β puede, no obstante, modificarse. Por ejemplo, usando células CD62L (L-selectina hi) como se describe en los Ejemplos, el TGF- β puede no ser necesario porque estas últimas son supresoras más potentes de GVHD que las células $CD4^+25^+$ no fraccionadas.

El uso de esferas anti-CD3/anti-CD28 indujo la proliferación robusta de células supresoras, teniendo el efecto de anticuerpo unido a plástico. La estimulación de CD28 también fortalece la activación de células Treg y una realización presente demuestra que las esferas recubiertas con anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28 (anti-CD3/CD28) mezcladas con células Treg en una relación 1:10 expande de manera óptima y conserva la función de las células Treg. El CD28 es un homodímero unido a disulfuro, expresado en la superficie de la mayoría de las células T (June et al., Immunol Today 11:211 (1990)). El CD28 puede identificarse mediante un número de anticuerpos monoclonales CD28 comercialmente disponibles, como sabría el experto en la técnica.

Se comprobó que los problemas iniciales de que la coestimulación podría anular la supresión (como lo hace en ensayos a corto plazo) carece de fundamentos. Cabe destacar que un recubrimiento con solo anti-CD3 en las esferas resultó ser un mal inductor de proliferación. De hecho, las células se desarrollaron hasta 5 a 10 veces más que en cultivos de CD3 inmovilizados equivalentes, y retuvieron la función supresora. Cultivos con función supresora y proliferación equivalente inducida por IL-2 o IL-15 (FIG. 11 y 12).

Una vez que se desarrolló un sistema factible para aislamiento, cultivo y ensayo razonablemente reproducible de células supresoras en la presente invención, fue entonces posible para los inventores variar sistemáticamente los parámetros para identificar métodos de mejorar el aislamiento y el cultivo de las células. Al implementar estrategias de purificación más rigurosas, se aislaron líneas celulares más potentes y reproducibles. Esto llevó a experimentos de titulación de microesferas anti-CD25 (titulación 1:6) y al desarrollo de un protocolo de purificación de doble columna, que luego condujo a una generación consistente de líneas celulares supresoras potentes (que tienen una tasa de éxito $\geq 80\%$). CD25 es la molécula IL-2R α (véase, p. ej., Waldmann, Immunol Today 14:264 (1993)), identificable mediante una serie de anticuerpos monoclonales comerciales (Ab o mAb, tal como se emplean en la presente invención) o mediante la unión de IL-2 marcada a CD25.

En la presente invención, se usó CD25 Ab para enriquecer la población de células para $CD4^+CD25^+$ en función de su expresión de CD25. Hacer esto antes de la estimulación reforzó la capacidad de expandir esas células Treg que tenían potentes actividades supresoras. De hecho, cuando se ensayaron diversas relaciones de anti-CD3 a anti-CD28 (20:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:20, respectivamente) en las microesferas, las esferas anti-CD28 de relación mayor indujeron la proliferación selectiva de las células T supresoras. Las esferas anti-CD3/anti-CD28 con una relación 1:5 y 1::20 generaron líneas celulares menos contaminadas con células T no supresoras. Las líneas celulares derivadas usando cantidades inferiores de anti-CD3 fueron más potentes y retuvieron la expresión de CD27 y CD62L muy incrementada, indicando que el fenotipo de las células T vírgenes de esas células se ha mantenido. Estos son marcadores de superficie celular comúnmente utilizados para distinguir células T vírgenes de células T de memoria (véase, p. ej., DeRosa, Nat. Med. 7: 245 (2001)). CD27 es un receptor que se pierde en la diferenciación de células efectoras, y CD62L y CCR7 son importantes para la migración de células hacia los órganos linfoides. Por lo tanto, *in vivo*, estas células supresoras lógicamente se dirigen normalmente a los órganos linfoides y restringen la activación y expansión de células alorreactivas en estos sitios, incluidos parches Peyers críticos para la inducción de GVHD.

Se ha descrito que en el sistema humano fue necesario aislar el subconjunto brillante $CD25^+$ de las células $CD4^+CD25^+$ con el fin de detectar la actividad supresora (con células recién aisladas) en ensayos de co-cultivos basados en anticuerpos (Baecher-Allan *et al.*, 2001). Esto también se halló en el sistema de cultivo preferido de la presente invención, en donde las células $CD4^+CD25^+$ purificadas más rigurosamente forman los mejores precursores de las líneas celulares supresoras. Contaminar las células $CD25^-$ en fracciones de $CD25^+$ puede hacer que las células brillantes $CD25^+$ crezcan y proliferen más y más rápido, y que entonces se impida la manifestación completa de la función de las células supresoras. Por ende, en las realizaciones preferidas de la presente invención se enfatiza la "purificación rigurosa" (preferiblemente dos ciclos de selección, y el lavado extenso). Se prefiere un "alto nivel de rigurosidad" para optimizar la pureza, incluso a expensas de un rendimiento celular inferior. El experto en la técnica conocería y entendería dichas técnicas altamente rigurosas.

Las titulaciones inferiores de microesferas magnéticas anti-CD25 (1/5 de la recomendación del fabricante) y una re-purificación en la segunda columna facilitaron en gran medida la generación de líneas celulares Treg con potentes capacidades de supresión. En comparación, el uso de titulaciones incluso inferiores de microesferas magnéticas recubiertas con mAb anti-CD25 o la adición de la etapa en una tercera columna a la purificación, no mejoró significativamente los resultados en comparación con aquellos del sistema de cultivo preferido (véase el Ejemplo 8), y de hecho, redujo el rendimiento de manera desventajosa.

Al aumentar la rigurosidad de la purificación de las células T CD4⁺CD25⁺, eventualmente las células brillantes CD25 aisladas ya no crecieron más, incluso con las esferas anti-CD3/anti-CD28. No obstante, después de intentar diversas poblaciones de células accesorias, se descubrió que las células T CD4⁺ irradiadas (usadas como "células alimentadoras") eran las mejores para facilitar el desarrollo de la presente invención. Las células parecieron segregarse factores de crecimiento de células supresoras, lo que incluye, aunque sin limitarse a ello, IL-2. No obstante, el medio acondicionado (sobrenadante de células T CD4⁺ estimuladas con anti-CD3/anti-CD28) facilitó en gran medida el desarrollo de células supresoras, incluso más que aquel que resultó del enriquecimiento de IL-2.

No obstante, también se contempla que las estrategias de expansión en cultivo alternativas, tales como aquellas que podría conocer el experto en la técnica, pueden no requerir la adición de una población de células alimentadoras. Por ejemplo, se pueden usar esferas anti-CD3/28 + IL-2, en cuyo caso las APC hospedantes y/o las células dendríticas pueden o no ser beneficiosas o requeridas.

Generación de líneas celulares supresoras mejoradas. En el transcurso de los experimentos, se descubrió que las líneas celulares supresoras eran susceptibles a proliferación por células no supresoras CD8⁺. Por lo tanto, se desarrolló un protocolo de purificación de dos etapas para extraer las células T CD8⁺. Esto incluyó un planteamiento de microesferas magnéticas de múltiples clases, en donde las células se tiñeron primero con anti-CD25 FITC (fluoresceína-5-isotiocianato) por métodos reconocidos, y luego se aislaron con microesferas anti-FITC, nuevamente usando métodos conocidos. Las esferas luego se escindieron de la preparación, seguidas por una segunda etapa en donde se usaron microesferas anti-CD8 para extraer las células T CD8⁺. Se añadieron anti-CD19, anti-CD20, anti-CD14 y anti-CD56 para despojar simultáneamente las células B, los monocitos y las células NK de la preparación. Se comprobó que las líneas celulares generadas a partir de esta estrategia de purificación se generaban de manera más reproducible (>90%) y más estable en tiempos de cultivo más prolongados que los otros métodos.

Usando el protocolo de purificación de dos etapas, fue posible explorar subconjuntos de CD4⁺CD25⁺ en poblaciones de células supresoras recién aisladas. Se hallaron subconjuntos menores de células CD4⁺CD25⁺ que incluían integrina β7 y CD200 (~10% de células CD4⁺CD25⁺), y se hallaron subconjuntos mayores que incluían LAIR (receptor 1 de tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos, véase, p. ej., Meyaard et al., *Immunity* (2):283-90) células CD101 (que representan ~80% de las células CD4⁺CD25⁺, véase, p. ej., Allez et al., *Gastroenterology* 123(5):1516-1526 (2002)). Las líneas celulares no expresan CD103 (integrina-alfa-E), expresada en altos niveles en un subconjunto potente de células CD4⁺CD25⁺ de ratón. Además, aproximadamente 20% de las células CD4⁺CD25⁺ expresan CD45RA. No se espera que este antígeno se exprese en células supresoras, ya que se ha descrito en varios informes que son CD45RO positivas (expresión en general mutuamente exclusiva, excepto transitoriamente durante la activación de células vírgenes). Sin embargo, el aislamiento de estas células fue mucho mejor que el de las células CD45RA⁻ para generar las líneas celulares supresoras (hasta la fecha se halló que 12/12 líneas celulares aisladas por este método son supresores potentes). En células T vírgenes, la variante de empalme CD45RA se expresa en la superficie de las células T. Una vez que la célula T se diferencia en una célula de memoria, usualmente expresa la isoforma CD45RO (véase, p. ej., DeRosa, 2001; Tchilian et al., *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 50(2):85-93 (2002)).

Si bien la mejor protección (a pesar del número inferior de células infundidas) estuvo mediada por el método de cultivo que resultó en la recuperación más baja (esplenocitos alogénicos, IL-2 de baja dosis y un factor de crecimiento (TGF-β), como se muestra en los ejemplos que siguen), los protocolos de cultivo se pueden modificar en vista de la información provista en este documento y de principios conocidos para optimizar tanto la expansión como la función supresora. Los esplenocitos alogénicos no resultaron en la expansión suficiente de células CD25⁺ incluso en presencia de alta dosis de IL-2 bajo estas condiciones clínicamente factibles en seres humanos en base a los hallazgos en el modelo de ratón. No obstante, se anticipa que una célula presentadora de antígenos más potente, tal como una célula dendrítica derivada de monocitos activados, produciría una mejor expansión y una función superior a través del envío de múltiples señales fisiológicas que podrían también auxiliar la supervivencia celular, como lo demuestran los ejemplos a continuación.

No obstante, debido a que las células CD4⁺CD25⁺ no requieren la activación mediante aloantígenos *per se* para inhibir las células T CD25 reactivas a aloantígenos (es decir, la población de células Treg despojadas de células CD25⁺), puede ser conveniente lograr la activación (y expansión) máxima mediante inductores policlonales de señalización de TCR, siempre y cuando la muerte celular inducida por activación no mitigue por completo el efecto beneficioso. "Activación" se refiere a estimular o fortalecer la proliferación celular y la división celular necesarias para producir las células descendientes de la población de células originales. Si bien hay una inhibición importante de la GVHD con las células CD25⁺ cultivadas con mAb anti-CD3 inmovilizado e IL-2 de alta dosis, la inclusión de TGFβ en cualquiera de los protocolos de activación puede garantizarse, ya que los datos presentados en este documento indican que el TGFβ es un factor de crecimiento para las células reguladoras CD25⁺, y adicionalmente que las torna resistentes a la muerte celular inducida por activación Yamagiwa *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001).

Sorprendentemente, la activación o maduración de las células dendríticas (DC) no condujo a eludir la supresión. "Maduración" es la conversión de la morfología y función de las APC de un estado inmaduro a uno maduro y activado. La DC activada es la APC más potente. Las células dendríticas pasan por los estados inmaduro>maduro>activado. En comparación, "activación" es la adquisición de las moléculas de la superficie celular y de las propiedades biológicas en células inmaduras o maduras. Por consiguiente, las células APC/DC son capaces

de soportar una respuesta inmunitaria. Una serie de señales y citocinas desencadena la diferenciación. TNF, PGE₂ e interferón pueden hacer que la DC pase de inmadura a madura; mientras que la señalización de CD40L o LPS puede hacer que una DC pase de madura a activada.

5 Por consiguiente, el presente descubrimiento proporciona en las células humanas un marcado contraste de lo que ha sido descrito para células Treg murinas recién aisladas, en donde la señalización mediada por oligodesoxinucleótidos de ADN que contienen LPS o CpG de DC derivadas de bazo llevó a la omisión de la supresión (Pasare et al., Science 299(5609):1033-1036 (2003)). Sin embargo, en ese sistema, las células Treg no fueron activadas en cultivo ni expandidas en cultivo.

10 En contraste, en las realizaciones preferidas de la presente invención, las células Treg humanas activadas y expandidas pueden invalidar las citocinas y las moléculas coestimuladoras expresadas por DC activadas, e incluso bloquear la respuesta MLR. El hallazgo de un incremento en la potencia de la función supresora después del cultivo concuerda con lo que se ha demostrado con la activación de las células Treg murinas. La función supresora depende de la activación (Shevach et al., 2002, supra), y el cultivo a corto plazo con anti-CD3 e IL2 aumenta la capacidad de supresión (Thornton et al., 2000). Esto se interpreta como que las células Treg cultivadas a largo plazo están cebadas (más sensibles) para la reactivación de TCR, y en consecuencia la función supresora inducida por TCR se expresa más fácilmente.

15 Para aumentar el rendimiento de las células CD4⁺ CD25⁺, permitiendo de este modo fortalecer el efecto anti-GVHD, se añaden citocinas al cultivo, p. ej., IL-4 e IL-7, que se demostró que aumentan la supervivencia de las células T (Vella et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3810-3815 (1998)), IL-10, que se demostró que es responsable de la generación de células T irregulares (Groux et al., Nature 389:737-42 (1997)) e IL-15 que se demostró que se sinergiza con IL-2 de baja dosis para inducir la proliferación vigorosa de células CD4⁺CD25⁺ humanas (Dieckmann et al., 2001).

20 Eficacia terapéutica de protocolos de activación y expansión. Un aporte importante de la presente invención es que este modelo permite la evaluación de la eficacia terapéutica *in vivo* de los protocolos de activación y expansión de células CD4⁺CD25⁺ en un modelo animal relevante. Debido a los déficits potenciales conocidos de las células cultivadas activadas en direccionamiento, migración, supervivencia y función *in vivo*, es importante que la función reguladora de las células reguladoras activadas y expandidas *ex vivo* se considere para aplicaciones *in vivo*, como también *in vitro*.

25 La función reguladora de las células CD4⁺CD25⁺ en respuestas inmunitarias a xenoantígenos o aloantígenos, el incremento en la letalidad de la GVHD resultante de la disminución en el número de CD25, así como también los datos de disminución de las cantidades *in vivo*, en donde se administra mAb anti-CD25 al receptor en la autoinmunidad, sugieren las terapias de relevancia clínica. mAb anti-CD25 administrado al receptor pre-trasplante en un intento de evitar la reducción del número de células T del donante reactivas para el hospedante que aumentaría la CD25 como un marcador de activación durante la GVHD, resultó en una GVHD acelerada. Esto fue sorprendente ya que, en base a la técnica anterior sola, se habría pronosticado que este escenario aliviaría la GVHD (Anasetti et al., Bone Marrow Transplant 7:375-381 (1991); Harris et al., Bone Marrow Transplant 23:137-144 (1999); Cahn et al., Transplantation 60:939-942 (1995); Blaise et al., Bone Marrow Transplant 8:105-111 (1991)). Sin embargo, dado que la GVHD empeoró mediante la infusión de mAb anti-CD25 antes del trasplante, parece que las células CD25⁺ hospedantes resistentes pueden también inhibir la generación de GVHD por el inóculo de células T del donante mediante un mecanismo de resistencia anti-donante del hospedante.

30 Como se expone en los ejemplos que siguen, las células CD4⁺CD25⁺ reguladoras inmunitarias expandidas y activadas *ex vivo* inhibieron significativamente la GVHD rápidamente letal *in vivo*. Como se observó anteriormente, se puede usar una variedad de tipos de células. Cuando se usan células de ganglios linfáticos, se contemplan todos los tipos de ganglios linfáticos (p. ej., inguinal, mesentérico, auxiliar superficial distal y similares), y pueden ser de pacientes sanos o enfermos, dependiendo del resultado deseado. Por ejemplo, las células de ganglios linfáticos que drenan de los tumores se pueden aislar, purificar y expandir en cultivo usando los métodos provistos en este documento. Una cantidad suficientemente grande de dichas células (es decir, un número adecuado para demostrar la reacción supresora o preventiva deseada tras la re-infusión al hospedante autólogo o la infusión al receptor alogénico) se purifica con un alto nivel de rigurosidad y se diluye en medio de cultivo sintético (p. ej., RPMI 1640 con suplementos típicos) bajo las condiciones descritas por el periodo de tiempo apropiado. Se puede emplear cualquier cantidad de técnicas de cultivo estándar (p. ej., placas de múltiples pocillos en una incubadora, por ejemplo, a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂). Para estimulación *ex vivo*, las células se extraen asépticamente del hospedante y se preparan suspensiones de células individuales bajo condiciones estériles. Las preparaciones de células se pueden filtrar
35 (p. ej., a través de una capa de malla de nylon), centrifugar y someter a un procedimiento de lisado suave, si es necesario.

40 Las células expandidas en cultivo *ex vivo* se pueden reintroducir al hospedante u otro paciente mediante una serie de planteamientos. Preferiblemente, se inyectan por vía intravenosa. Opcionalmente, el hospedante se puede tratar con agentes para promover la función *in vivo* y la supervivencia de las células estimuladas (p. ej., IL-2 o IL-15). Por supuesto, las células expandidas en cultivo pueden también introducirse en una diversidad de formulaciones

farmacéuticas. Estas pueden contener dichos aditivos normalmente empleados como aglutinantes, filtros, vehículos, agentes de estabilización, emulsionantes y tampones. Los diluyentes y excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, disolución salina y dextrosa, como se utilizan en los métodos que se describen a continuación.

5 Por lo tanto, o bien las células del donante (alógeno) o del tipo del hospedante CD25⁺ (autólogas) son útiles para inhibir las respuestas de GVHD, y se sugiere que el mantenimiento de las células CD25⁺ del hospedante sería clínicamente conveniente. Ya que se ha demostrado que las células reguladoras CD4⁺ CD25⁺ humanas inhiben las
 10 alorrespuestas *in vitro* tanto de células T CD4⁺ vírgenes como de memoria, y pueden expandirse *in vitro* con el mantenimiento de la función supresora (Dieckmann *et al.*, 2001; Levings *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2001), estos principios son aplicables a la presente invención. El informe de Levings es la única descripción de expansión policlonal de CD4⁺ CD25⁺ humana que usa anti-CD3 soluble y células linfoblastoides y PBMC como células
 15 alimentadoras +IL-2. Sin embargo, la función supresora observada por Levings *et al.* fue meramente una reducción del 65% de la proliferación en una relación célula supresora/respondedora de 1:1, que fue menos que la típicamente observada con células Treg de ratón. Por lo tanto, el informe de Levings *et al.* no se considera relevante con respecto a los métodos de expansión en cultivo *ex vivo* a largo plazo empleados en la presente invención.

15 Métodos terapéuticos. Los métodos son particularmente útiles para seres humanos, pero pueden también implementarse en sujetos veterinarios. Un "individuo", "sujeto", "paciente" u "hospedante" al que se hace referencia es un vertebrado, preferiblemente un mamífero. Más preferiblemente, dicho individuo es un ser humano y las células
 20 expandidas en cultivo son humanas, aunque los animales, incluidos modelos animales para estados de enfermedad humanos, también se incluyen en la presente invención, y los tratamientos terapéuticos de dichos animales, aunque no forman parte de la invención reivindicada, también se contemplan en este documento. Dicho modelo animal se puede usar para ensayar y ajustar las composiciones y métodos de la presente invención, si se desea. Determinados modelos implican inyectar a animales líneas consanguíneas de células celulares singénicas establecidas. También son útiles los modelos animales quiméricos, descritos en las patentes de Estados Unidos
 25 núm. 5.663.481, 5.602.305 y 5.476.993; la solicitud EP 379.554; y la solicitud internacional WO 91/01760. Los mamíferos no humanos incluyen, aunque sin limitarse a ello, animales veterinarios o de granja, animales deportivos y mascotas. Por consiguiente, en oposición a los modelos animales, dichos animales pueden estar sometidos a tratamientos terapéuticos seleccionados.

30 El estado inmunitario del receptor u hospedante puede ser cualquiera de los siguientes. El individuo puede ser inmunológicamente virgen con respecto a ciertas células que presentan antígenos (APC) o a antígenos asociados con tumores (TAA) presentes en la composición. El individuo puede no estar expresando actualmente inmunidad antitumoral, pero puede tener memoria inmunológica, particularmente memoria de células T relacionada con un antígeno particular.

35 Las composiciones que contienen la presente población de células modificadas y/o activadas y o fortalecidas, o un cóctel de las mismas, pueden ser para uso como medicamento (para los tratamientos profilácticos y/o terapéuticos). Cuando se usan como composiciones de medicamentos, se administran a un paciente en una cantidad suficiente para prevenir, suprimir, bloquear o inhibir, o por lo menos reducir parcialmente, la respuesta inmunogénica, tal como
 40 aquella que tiene lugar antes del inicio de la GVHD o durante la respuesta de la GVHD y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmunitario del paciente, pero en general oscilan entre aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,2 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 1,5 mg/kg de peso corporal.

45 En usos profilácticos, las composiciones que contienen la presente población modificada y/o activada y fortalecida, o un cóctel de la misma, se administran a un paciente ya enfermo para mejorar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen nuevamente del estado de salud y del nivel general de inmunidad del hospedante, pero está en general en los intervalos anteriormente descritos.

50 Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones se pueden llevar a cabo con niveles de dosis y patrones seleccionados por el médico a cargo. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deberán proporcionar una cantidad de las células CD25 modificadas de la presente invención suficiente para tratar al paciente en forma eficaz.

55 Los términos "inmunógeno" o "composición inmunogénica" o "vacuna" se utilizan en este documento para hacer referencia a un compuesto o composición, según sea adecuado, capaz de: a) generar una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un individuo virgen; o b) reconstituir, potenciar o mantener una respuesta inmunitaria en un individuo. La respuesta inmunológica puede comprender anticuerpos, células inmunorreactivas (tales como células cooperadoras/inductoras o citotóxicas), o cualquiera de sus combinaciones.

La "inactivación" de una célula se usa en este documento para indicar que la célula se ha vuelto incapaz de división celular para formar descendencia. La célula, no obstante, puede ser capaz de responder a estímulos, a la biosíntesis y/o segregación de productos celulares tales como citocinas. Los métodos de inactivación se conocen en la técnica.

Los métodos de inactivación preferidos son el tratamiento con toxinas, tal como mitomicina C, o irradiación. Otros ejemplos de células inactivadas son células que se han fijado o permeabilizado y son incapaces de división.

En general, la práctica de los métodos abarcados en la presente invención emplearán, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas y definiciones necesarias se explican en su totalidad en la bibliografía, tal como en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (Sambrook et al., 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (Gait, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (Freshney, ed., 1987); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (Weir & Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller & Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al., eds., 1991). Los procedimientos generales para la preparación y administración de composiciones farmacéuticas se señalan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición (1990), Martin ed., Mack Publishing Co., Pa.

El individuo tratado puede estar exhibiendo una respuesta autoinmunitaria (inmunidad humoral o celular, o ambas) o GVHD. No obstante, el sujeto debería ser por lo menos parcialmente inmunocompetente, como para minimizar una reacción de GVHD de alcance patológico. Sin embargo, se reconoce que los pacientes con cáncer o aquellos afectados por enfermedades autoinmunitarias o inmunológicas a menudo exhiben un grado de inmunosupresión, y esto no necesariamente previene el uso de las composiciones de la invención, siempre y cuando las composiciones puedan administrarse de modo seguro y eficaz. Los ejemplos de tipos de cáncer que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a ello, tumores de sitios que se cree están privilegiados por la inmunidad, tales como el cerebro, y sitios que no lo están, tales como pulmón, colon, mama, hígado, útero u ovario, páncreas, próstata, piel y sangre, así como también muchos otros sitios específicos y no específicos del cuerpo humano o animal. Los expertos en la técnica conocen los ejemplos de dichos tumores e incluyen cáncer de pulmón de células pequeñas.

Modos de administración y dosis. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar al sujeto por cualquier método reconocido, o bien sistémicamente o en un sitio localizado. El momento más conveniente para administrar las células aloactivadas para prevenir la GVHD en un paciente de trasplante o en un paciente con cáncer es durante el momento de la cirugía. Para mantener las células en el sitio hasta completar el procedimiento quirúrgico, es conveniente administrar las células en un gel artificial farmacéuticamente compatible, o en plasma coagulado o utilizando cualquier mecanismo conocido de liberación controlada.

Cuando se desean procedimientos menos invasivos, la composición puede inyectarse en un sitio deseado a través de una aguja. Para sitios más profundos, la aguja puede posicionarse usando técnicas de ultrasonido endoscópicas, radioescintigrafía o alguna otra técnica de imágenes, sola o combinada con el uso de un alcance o cánula apropiado. Para dichas aplicaciones, la población celular se administra convenientemente suspendida en disolución salina isotónica o en un tampón neutro hasta un volumen de aproximadamente 10 ml.

De modo similar, antes de o simultáneamente con un trasplante alogénico, una cantidad eficaz de células CD4⁺CD25⁺ aisladas, preferiblemente modificadas para mejorar o potenciar en cultivo su efecto supresor, se administra como implante celular al receptor del trasplante (el hospedante) en una cantidad suficiente para prevenir o bloquear la aparición de GVHD. Alternativamente, el implante celular se administra después del trasplante alogénico para bloquear, inhibir o revertir la GVHD que puede ya haber comenzado. La dosis administrada es una cantidad "eficaz" para lograr la respuesta terapéutica deseada, sea esta la estimulación de una respuesta inmunitaria o el tratamiento del cáncer según lo definido en otra parte de esta descripción. Para las composiciones farmacéuticas de la presente invención, las dosis eficaces típicamente yacen dentro del intervalo de aproximadamente 10⁶ a 10¹² células, más preferiblemente 10⁸ a 10¹¹ células, incluidas estimuladoras alogénicas y respondedoras. Preferiblemente, se usan entre aproximadamente 1x10⁹ y 5x10¹⁰ células; más preferiblemente entre aproximadamente 2x10⁹ y 2x10¹⁰. En promedio, tanto como 1x 10⁹ células Treg expandidas en cultivo serán necesarias para ensayos clínicos en un ser humano. Las dosis múltiples, cuando se utilizan en combinaciones para lograr un efecto deseado, yacen dentro de la definición de una cantidad eficaz.

Los diversos componentes de la composición implantada o inyectada están presentes en una "combinación eficaz", lo que significa que hay suficientes cantidades de cada uno de los componentes para que la composición sea eficaz. Preferiblemente, están presentes por lo menos aproximadamente 1x10⁸, más preferiblemente aproximadamente 1x10⁹ a 5x10¹⁰ y lo más preferiblemente aproximadamente 2x10⁹ a 2x10¹⁰ células respondedoras. Preferiblemente, están presentes por lo menos aproximadamente 1x10⁷, más preferiblemente entre aproximadamente 5x10⁷ y 5x10⁹ y; más preferiblemente entre aproximadamente 1x10⁸ y 2x10⁹ células supresoras. Las relaciones de linfocitos alogénicos a leucocitos supresores es en general entre 1:1 y 100:1, usualmente entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 25:1, y típicamente aproximadamente 10:1, como se describe en más detalle en los ejemplos específicos del presente documento. No obstante, se puede usar cualquier número de células componentes u otros constituyentes, siempre y cuando la composición sea eficaz como un todo. Esto también dependerá de las condiciones de cultivo y de otros factores durante la preparación.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar después, antes, en lugar de, o en combinación con otras terapias relacionadas con la generación de una respuesta inmunitaria, tratamiento del cáncer o reducción del efecto de la GVHD. Por ejemplo, el sujeto puede haber estado previamente o concurrentemente en el proceso de tratamiento con quimioterapia, radioterapia y otras formas de inmunoterapia y transferencia adoptiva.

5 Si se utilizan dichas modalidades, preferiblemente se emplean en un modo o en un momento que no interfiere con la inmunogenicidad de las composiciones de la presente invención. El sujeto puede también haber recibido la administración de otra composición, tal como una vacuna, con el fin de estimular una respuesta inmunitaria. Dichas composiciones alternativas pueden incluir vacunas de antígenos de tumores, vacunas de ácido nucleico que codifican antígenos de tumores, vacunas anti-idiotipo y otros tipos de vacunas celulares, incluidas líneas celulares de tumores que expresan citocinas. Cuando las células Treg expandidas en cultivo derivan de un origen específico, tal como un tumor o una célula cancerosa, el término está destinado a incluir, por ejemplo, no solamente una célula cancerosa primaria, sino también cualquier célula derivada de un predecesor de células cancerosas, células de cáncer metastásico y cultivos *in vitro* y líneas celulares derivadas de células cancerosas.

15 Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren al uso de células producidas de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención en terapias combinadas. Las células T CD4⁺CD25⁺ alogénicas o autólogas expandidas en cultivo *ex vivo* se pueden preparar para administración por infusión a un sujeto ya sea antes, durante o después del trasplante de tejido para promover el injerto y suprimir o prevenir las respuestas de GVHD. Si bien se describe una sola infusión, dichas infusiones pueden administrarse semanalmente por un periodo de tiempo (tal como 4-6 semanas) después del implante celular para potenciar el grado de la respuesta supresora en el hospedante o la eficacia terapéutica. Las infusiones también se pueden administrar después de intervalos de varios meses con el fin de reforzar la respuesta. Por consiguiente, se puede administrar un implante celular y posteriormente realzar el efecto terapéutico o la respuesta inmunológica administrando al paciente una composición que comprende células T CD4⁺ CD25⁺ humanas aloactivadas autólogas o alogénicas al paciente, pero tratadas *ex vivo*. Determinadas realizaciones pueden además comprender una población de células inactivadas de células tumorales o su prole, cuando el paciente es un paciente o prole con cáncer.

Un trasplante de células alogénicas también proveería los resultados deseados, aunque puede requerir más células que si se usaran células autólogas. Asimismo, las células purificadas con un alto nivel de rigurosidad y desprovistas de CD25 para reducir el volumen de células necesarias para lograr un efecto terapéutico en el paciente y potenciar la eficiencia del implante celular, tienen una mayor probabilidad de éxito.

30 El tiempo de administración de las composiciones de la presente invención está dentro del criterio del médico controlante y depende del estado clínico del paciente, los objetivos del tratamiento y las terapias concurrentes que también se estén administrando. Los medios adecuados de monitoreo inmunológico incluyen MLR unilateral usando PBL del paciente como respondedores y células de tumores primarios como estimuladoras. Una reacción inmunológica puede también manifestarse mediante una respuesta inflamatoria demorada en el sitio de inyección. 35 Los medios adecuados para supervisar la efectividad del tratamiento de células Treg pueden incluir ensayos *in vitro*, tales como MLR, o rastreo *in vivo*, tal como exploración CT, resonancia magnética nuclear (RMN), radioescintigrafía con un agente de toma de imágenes adecuado, supervisión de antígenos de marcadores tumorales circulantes, y la respuesta clínica del sujeto. Se pueden administrar dosis adicionales, tales como mensuales o semanales, hasta lograr el efecto deseado. De allí en más, y particularmente cuando el beneficio inmunológico o clínico parezca menguar, se podrán administrar dosis adicionales de refuerzo o de mantenimiento según sea necesario. 40

45 Cuando se administran múltiples implantes celulares o combinaciones de implantes y vacunas celulares al mismo paciente, se debe prestar atención a la posibilidad de que los linfocitos alogénicos en la vacuna puedan generar una respuesta anti-alotipo. El uso de una mezcla de células alogénicas de una pluralidad de donantes, y el uso de diferentes poblaciones celulares alogénicas en cada dosis, son ambas estrategias que pueden ayudar a minimizar la aparición de una respuesta de tipo anti-alotipo.

Durante el transcurso de la terapia, el sujeto es evaluado periódicamente para efectos colaterales secundarios tales como una respuesta febril. Los efectos colaterales se controlan con cuidado clínico de soporte adecuado.

Los linfocitos tumorales pueden tornarse anergizados en el transcurso del crecimiento del tumor *in vivo* y volverse resistentes a la activación o expansión.

50 Varias citocinas pueden revertir parcialmente la anergia de las células T de memoria, a saber, IL-2, IL-4, IL-15 o IL-1 más IL-6. Estas citocinas pueden promover la proliferación de las células T y pueden representar una "segunda señal" esencial típicamente provista por las células que presentan antígenos. En consecuencia, la capacidad de respuesta de los linfocitos sensibilizados de tumores puede restaurarse co-cultivando con diversas citocinas y mitógenos, tales como anticuerpo anti-CD3 o conconavalina A.

55 La presente invención se describe además mediante ejemplos. Estos ejemplos se proveen con propósitos ilustrativos solamente, y no tienen como fin ser limitativos, a menos que se especifique algo distinto. Los distintos escenarios son relevantes para muchas situaciones prácticas, y tienen como fin ser meramente ilustrativos para los expertos en la técnica. Estos ejemplos no tienen como fin interpretarse como limitativos del alcance de las

reivindicaciones anejas, en cambio, se debe interpretar que dichas reivindicaciones abarcan todas y cada una de las variaciones que se tornan obvias como resultado de las descripciones que se dan a conocer en este documento.

Ejemplos

5 Los materiales y métodos descritos en el Ejemplo 1 se usaron comúnmente en los Ejemplos 2-5, mientras que aquellos descritos en el Ejemplo 6 se usaron comúnmente en el Ejemplo 7.

Ejemplo 1 - Aumento de la proporción de células CD4⁺CD25⁺ en pacientes con NSCLC.

10 Se recogió sangre periférica y tumor de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en estado I o II al momento de la cirugía después de obtener el consentimiento informado apropiado conforme a los protocolos aprobados por el Comité de Revisión Institucional. Se procesaron muestras nuevas de tumores de 8 pacientes con NSCLC por disección mecánica estéril seguida de digestión enzimática, como lo describen Woo *et al.*, 2001. Las células se separaron en un gradiente de densidad Percoll (Pharmacia Biotech AB, Suecia). Se obtuvo sangre periférica al momento de recolección del tumor, se procesó como lo describen Woo *et al.*, 2001, y se congeló.

15 La producción de citocinas se determinó disponiendo 70.000 células CD3⁺CD4⁺CD25⁻ o CD3⁺(-CD4⁺CD25⁺) en placas de 96 pocillos (Falcon, Franklin Lakes, NJ) en cultivo durante 2 días en un volumen total de 200 μ l. Los sobrenadantes luego se recogieron y ensayaron para producción de citocinas usando TGF- β Quantikine humano, IL-2 y kits de IL-10 ELISA (R&D Systems, Mineápolis, MN).

20 La población de CD25 respectiva se digirió y los linfocitos infiltrantes de tumores se analizaron por citometría de flujo (FIG. 1). Para ensayos de proliferación, se recubrieron placas de 96 pocillos con 1 μ g/ml de anti-CD3 (Kung *et al.*, Science 206:347-349 (1979)) o 1 μ g/ml de anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28 (Hansen *et al.*, Immunogenetics 10:247-260 (1980)) durante la noche a 37°C. Los linfocitos de sangre periférica de pacientes o de donantes normales se descongelaron y cultivaron en RPMI 10% FCS (Hyclone, Logan, UT) a 5x10⁴ células (200 μ l) por pocillo por triplicado a 37°C, 5% CO₂. Las células T CD3⁺CD4⁺CD25⁻ o CD3⁺(-CD4⁺CD25⁺) purificadas se añadieron en cantidades variables (0-20,000 dependiendo del ejemplo). Se llevaron a cabo experimentos de bloqueo con 10 μ g/ml anticuerpo anti-TGF- β (R&D Systems). La proliferación se ensayó midiendo la incorporación de [³H]timidina (Stephens *et al.*, 2001). El enriquecimiento de las células CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁻ o CD3⁺(-CD4⁺CD25⁺) se llevó a cabo en un clasificador celular Cytomation (Fort Collins, CO) MoFlo Cell Sorter (seleccionando linfocitos, células T CD3⁺CD4⁺).

30 Por lo tanto, cuando la frecuencia (%) de los linfocitos CD4⁺CD25⁺ presentes en la población total de células CD4⁺ aislada de muestras de tumor de cáncer de pulmón, según lo comparado con linfocitos de sangre periférica (PBL) de los pacientes con cáncer de pulmón, se determinó por citometría de flujo, se determinó que el 33% de los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) eran CD4⁺CD25⁺. Esto coincidió con el fenotipo activado de células T reguladoras. En la FIG. 1, las distribuciones y medias se muestran como PBL de donantes normales, n=7; linfocitos infiltrantes de tumores sin estimulación (TIL) de pacientes con NSCLC, n=8; o PBL sin estimulación de pacientes con NSCLC, n=9. Notablemente, la sangre periférica de los pacientes con NSCLC tuvo un incremento similar en los porcentajes de células CD4⁺CD25⁺.

40 En cambio, menos del 15% de los PBL de donantes normales tuvieron este fenotipo celular CD4⁺CD25⁺, que fue coherente con los informes previos (Shimizu *et al.*, J. Immunol. 163:5211-5218 (1999); Jonuleit *et al.*, 2001); Levings *et al.*, 2001; Dieckmann *et al.*, 2001).

Ejemplo 2 - Expresión superficial constitutiva brillante de CD152 (CTLA-4) en linfocitos infiltrantes de tumores.

Estudios recientes han demostrado que el CTLA-4 se incrementa en células reguladoras de ratón y humanas (Jonuleit *et al.*, 2001; Dieckmann *et al.*, 2001; Read *et al.*, 2000). Por consiguiente, los linfocitos de donantes normales y pacientes con NSCLC se analizaron para expresión de CD4, CD25 y CTLA-4 por citometría de flujo.

45 La expresión superficial brillante a niveles comparables con los niveles de CD4 y CD8, en lugar de la expresión tenue o indetectable de CTLA4 que se observa usualmente (a menudo requiere la permeabilización de la célula con el fin de detectar la expresión de CTLA-4) de CTLA-4, se detectó en linfocitos en reposo derivados de muestras de tumores (FIG. 2), mientras que en células T en reposo de donantes normales, menos del 1% de las células T fueron positivas para expresión de CTLA-4 (no se muestran los datos). Por lo tanto, a partir de una evaluación de 2 pacientes representativos que demuestran expresión de CTLA-4 en TIL y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de CD4⁺CD25⁻ y CD4⁺CD25⁺, se muestra un histograma de flujo en la FIG. 2A, mientras que la FIG. 2B muestra el porcentaje de la media (\pm S.E.) de células que expresan CTLA-4 en linfocitos infiltrantes de tumores CD4⁺CD25⁻ (izquierda), TIL CD4⁺CD25⁺ (centro) y PBMC CD4⁺CD25⁺ (derecha) de 5 pacientes con NSCLC consecutivos. Entre las células CD4⁺CD25⁺ de muestras de tumores, el 80% fueron positivas y demostraron aumento de la expresión de CTLA-4. En contraste, menos del 10% de los linfocitos CD4⁺CD25⁻ en las muestras de tumores fueron positivos para CTLA-4.

Con el fin de excluir la unión de CTLA-4 liberados a moléculas B7 que se expresan en células T humanas activadas (Greenfield et al., J. Immunol. 158:2025-2034 (1997)), se midió el ARNm de CTLA-4 por PCR cuantitativa. Se observaron niveles sustancialmente superiores de ARNm de CTLA-4 (2 a 7 veces; n=3 pacientes) en las células CD4⁺CD25⁺ que en las células CD4⁺CD25⁻ (no se muestran los datos). En contraste con la expresión casi uniforme de CTLA-4 en células CD4⁺CD25⁺ en muestras de tumores, solamente el 30% de las células CD4⁺CD25⁺ periféricas de pacientes con cáncer de pulmón se tiñeron positivas para CTLA-4 (FIG. 2).

Ejemplo 3 - Las células CD4⁺CD25⁺ infiltrantes de tumores inhiben la proliferación de células T de sangre periférica autóloga.

Para evaluar la función de las células CD4⁺CD25⁺ CTLA-4⁺ en pacientes con cáncer de pulmón, se separaron células CD4⁺CD25⁺ del resto de los linfocitos infiltrantes de tumor por clasificación celular de alta velocidad, y se determinaron su capacidad proliferativa y efecto sobre la proliferación de células T. Las células T reguladoras habitualmente no pueden proliferar en respuesta a la estimulación mitogénica (Shevach et al., J. Exp. Med. 193:F41-F46 (2001)). Para confirmar esto, se estimularon 50.000 linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) CD4⁺CD25⁺ o CD3⁺ despojados de células CD4⁺CD25⁺ con anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizado. Las células CD3⁺ despojadas de células CD4⁺CD25⁺ proliferaron, mientras que las células CD4⁺CD25⁺ no lo hicieron (no se muestran los datos).

Luego se estimularon los linfocitos de sangre periférica autóloga bajo condiciones subóptimas u óptimas en presencia de cantidades en aumento de las células reguladoras putativas. Los PBL autólogos se cultivaron solos o con cantidades en aumento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) CD4⁺CD25⁺ o CD4⁺CD25⁻ purificados por clasificación de muestras de cáncer de pulmón. Se añadieron TIL CD4⁺CD25⁺ a los cultivos control. La proliferación subóptima se indujo con anti-CD3 soluble o anti-CD3 inmovilizado, y la proliferación óptima se indujo con anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados. La incorporación de [³H]timidina se midió durante las últimas 18 horas de un cultivo de 4 días. Los resultados se expresaron como el porcentaje de respuesta de PBL cultivados solos. El 100% de proliferación para el gráfico CD25⁻ fue 37081 ± 4094 cpm, y 29465 ± 1007 cpm para el gráfico CD25⁺.

Como se anticipó, se observó que el anti-CD3 soluble estimuló bajos niveles de proliferación, y que la inhibición directa de anti-CD3 soluble estimuló la proliferación con la adición de células T CD4⁺CD25⁺ infiltrantes de tumores (FIG. 3A). De todos modos, el anti-CD3 inmovilizado (unido a la placa) indujo proliferación más vigorosa, y hubo una reducción dependiente de la dosis en la proliferación de las células T con la adición de células CD4⁺CD25⁺.

No obstante, en contraste con los informes previos en células T de ratón (Thornton et al., 1998), la proliferación óptima estimulada por anti-CD3 y anti-CD28 (anti-CD3/CD28 inmovilizados en plástico) también se suprimió con la adición de tan solo 10-20% linfocitos CD4⁺CD25⁺ derivados de muestras de cáncer de pulmón (FIG. 3B). Esta inhibición fue potente. En 5 pacientes consecutivos, la adición de 10.000 células T CD4⁺CD25⁺ a 50.000 PBL autólogos produjo una inhibición media de 60% de la proliferación estimulada con anti-CD3/CD28 de PBL autólogos. En contraste, ni los linfocitos infiltrantes de tumores CD3⁺ desprovistos de células CD4⁺CD25⁺ (FIG. 3B), ni los PBL irradiados (no se muestran los datos) cultivados con células respondedoras suprimieron la proliferación de PBL autólogos, lo que demuestra que los efectos no se debieron a deficiencias de espacio o nutrientes.

Ejemplo 4 - Los linfocitos infiltrantes de tumores CD4⁺CD25⁺ no pueden suprimir los PBL alogénicos.

Para determinar la capacidad de las células T CD4⁺CD25⁺ infiltrantes de tumores recién aisladas de inhibir la proliferación de células T de sangre periférica, las células T periféricas alogénicas de donantes normales o PBL autólogos de pacientes con cáncer de pulmón no relacionado (NSCLC) se cultivaron con células CD4⁺CD25⁺ infiltrantes de tumores de pacientes con cáncer (la cantidad de células usadas se muestra en las FIG. 4A y 4B, respectivamente). Todos los cultivos celulares en este Ejemplo se estimularon con anti-CD3/CD28 unido a la placa. La incorporación de [³H]timidina se midió durante las últimas 18 horas de un cultivo de 4 días.

Las células T CD4⁺CD25⁺ no fueron capaces de inhibir la proliferación de PBL estimulados con anti-CD3/anti-CD28 de donantes normales (FIG. 4A); y de hecho hubo un efecto proliferativo potenciado con números en aumento de células T CD4⁺CD25⁺. En un cultivo comparativo, las células T CD4⁺CD25⁺ derivadas de tumor inhibieron eficazmente la proliferación inducida por anti-CD3/28 de PBL autólogos (FIG. 4B), confirmando la función inhibidora de esta población de células T CD4⁺CD25⁺ derivadas de tumor. Los resultados se expresan como la media de cultivos triplicados (±S.E.) para uno de tres experimentos independientes en la FIG. 4A, o uno de dos experimentos independientes en la FIG 4B, cada uno con resultados similares.

Las células T de sangre periférica de un donante normal se cultivaron luego con células T de donante CD4⁺CD25⁺ de sangre periférica purificadas por clasificación autóloga. Como fue el caso con las células CD4⁺CD25⁺ derivadas de tumor, la proliferación de los PBL respondedores de donantes normales se suprimieron cultivándolos con cantidades en aumento de células T CD4⁺CD25⁺ autólogas aisladas de sangre periférica (FIG. 4C). Los resultados se expresan en la FIG. 4C como la media de los cultivos triplicados (± S.E.) para uno de dos experimentos independientes, cada uno con resultados similares.

Las células CD4⁺CD25⁺ o CD4⁺CD25⁻ infiltrantes de tumores se cultivaron luego con PBL alogénico de un paciente con NSCLC. Sin embargo, las células CD4⁺CD25⁺ derivadas de tumor del paciente A no pudieron inhibir la proliferación de PBL del paciente B, un paciente NSCLC no relacionado, como se muestra en la FIG. 4D. Los

resultados se expresan en la FIG. 4D como la media de los cultivos triplicados (\pm S.E.) para uno de dos experimentos independientes, cada uno con resultados similares.

Juntos, estos experimentos indican que los tumores infiltrantes de células T reguladoras suprimen en forma potente la proliferación inducida por mitógenos de células T autólogas, pero no pueden suprimir la proliferación de PBL alogénicos.

Ejemplo 5 - No se requiere TGF- β para la inhibición de la proliferación.

Para determinar si la segregación de TGF- β por las células T reguladoras aisladas de tumores contribuyó a su función supresora, se dispusieron en cultivo células CD4⁺CD25⁺ y CD3⁺ despojadas de CD4⁺CD25⁺ de muestras de cáncer de pulmón durante 2 días. Se ensayaron los sobrenadantes para TGF- β por ELISA. En los resultados, que representan de 1 a 6 pacientes (\pm S.E para pocillos triplicados), las células T CD4⁺CD25⁺ purificadas por clasificación y no estimuladas produjeron cantidades significativas de TGF- β (FIG. 5A), pero no se detectó producción de IL-2 e IL-10 por ELISA (no se muestran los datos).

Se cultivaron PBL autólogos solos o con cantidades variables de células CD4⁺CD25⁺ y se estimularon con anti-CD3/CD28 unido a la placa. Se añadió anticuerpo neutralizante anti-TGF- β a 0 μ g/ml y 10 μ g/ml. La incorporación de [³H]timidina se midió durante las últimas 18 horas de un cultivo de 4 días. Los resultados se expresaron como la media de los cultivos triplicados (\pm S.E.) para uno de dos experimentos independientes con resultados similares. La adición de 10 μ g/ml de anticuerpo anti-TGF- β (que se sabe que es suficiente para neutralizar los efectos de 50 ng/ml de TGF- β) no anuló el efecto supresor de las células T CD4⁺CD25⁺ sobre la proliferación de PBL autólogos inducida por anti-CD3/28 (FIG. 5B). Por consiguiente, juntas, las FIG. 5A y 5B demuestran que la segregación de TNF- β constitutiva por células CD4⁺CD25⁺ infiltrantes de tumores no es necesaria para la inhibición de la proliferación de PBL autólogos.

Ejemplo 6 - La disminución del número de células CD4⁺CD25⁺ reguladoras inmunitarias produce la aceleración de la mortalidad por GVHD *in vivo*.

En estudios anteriores se había demostrado que las células reguladoras inmunitarias CD4⁺CD25⁺ son necesarias para la inducción *ex vivo* de tolerancia a aloantígenos mediante el bloqueo coestimulador (Taylor *et al.*, 2001). Asimismo, la adición de cantidades graduales de células B6 CD4⁺CD25⁺ recién purificadas resultó en la supresión dependiente de la dosis de las alorrespuestas en una MLR compuesta por estimuladores bm12 respondedores e irradiados con B6 CD4⁺CD25⁻, mientras que las células T CD4⁺ despojadas de CD25 resultaron en una respuesta elevada (Taylor *et al.*, 2001). Como consecuencia, la función potencial de estas células supresoras profesionales se investigó en la regulación de las respuestas de las células T a los aloantígenos y en la generación de la enfermedad injerto contra hospedante (GVHD).

Para purificar células T enteras o CD4⁺, en este y en los siguientes Ejemplos 7 y 8, usando las células T derivadas de ratones, se trituraron ganglios linfáticos axilares, mesentéricos e inguinales, y las suspensiones de células individuales se pasaron por una malla de alambre y se recogieron en PBS que contenía 2% de suero bovino fetal (FBS) (HyClone, Logan, UT). Las preparaciones celulares se despojaron de las células NK (hibridoma PK136, rata IgG2a) y células T CD8⁺ (para purificación celular CD4⁺) (hibridoma 2.43, IgG2b de rata) por incubación con anticuerpos monoclonales (mAb), seguidas de pasaje a través de una columna recubierta con Ig antirrator de cabra y antirrator de cabra (Collect Cell Enrichment Immunocolumns, Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá). La composición final de células T purificadas se determinó por análisis de citometría de flujo como $\geq 94\%$ células T enteras o CD4⁺.

Si se indica, se disminuyó el número de células reguladoras inmunitarias CD25⁺ por incubación con mAb anti-CD25 (hibridoma 3C7, IgG2b de rata, BD PharMingen (San Diego, CA) y Dynabeads antirrator de oveja (DynaL, Lake Success, NY) y se determinó una reducción del número de esas células $>95\%$. Para enriquecer las células CD4⁺CD25⁺, se incubaron células CD4⁺ purificadas con biotina anti-CD25 (hibridoma 7D4, IgM de rata), seguidas de estreptavidina-PE (ambos BD PharMingen). Después de la incubación con Microesferas MACS anti-PE, las células se seleccionaron positivamente en una columna de separación MS o VS MACS (ambas Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se determinó que las células eran $>90\%$ CD4⁺CD25⁺ (también denominadas simplemente "células CD25⁺".)

Efecto del nivel de irradiación y disminución del número de células CD25⁺ del donante. Para determinar si la disminución del número de células CD25⁺ en un inóculo del donante de células T resultaría en una aceleración o incremento de la mortalidad por GVHD *in vivo*, o si la mortalidad por GVHD fue operativa solamente bajo condiciones de irradiación corporal total (TBI) subletal. Se usaron ratones B6.C-H2^{bm12}/KhEg (bm12) (H2^b) de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) de 8-12 semanas de vida. Todos los ratones fueron alojados en una instalación libre de patógenos en jaulas de microaislamiento. Los receptores de bm12 fueron irradiados de manera subletal (en este experimento particular y a lo largo de todo el ejemplo) exponiendo a los ratones a 6,0 Gy TBI de una fuente de ¹³⁷Cesio con una dosis de 85 cGy/minuto, 4 horas antes de la infusión celular. Los ratones bm12 irradiados en forma subletal recibieron, en el primer experimento, 1×10^5 células T B6 CD4⁺ enteras distintas de clase II o células T B6 CD4⁺ despojadas de CD-25 (FIG. 6A), mientras que en un segundo experimento, recibieron $0,5 \times 10^5$ de las mismas células T B6 CD4⁺ enteras o células T CD4⁺ despojadas de CD25 (FIG. 6B). Las células se administraron por vía intravenosa.

Se supervisó a los ratones diariamente para supervivencia y se pesaron dos veces a la semana, además de ser examinados para detectar la aparición clínica de GVHD. Los datos de supervivencia se analizaron por métodos de tablas de expectativas de vida, y se exponen las tasas de supervivencia actuariales. Se realizaron comparaciones grupales por estadísticas de la prueba de rango logarítmico. $P \leq 0,05$ se consideró significativo. En la dosis mayor, todos los ratones murieron de GVHD (FIG. 6A); mientras que con la dosis reducida, la tasa de supervivencia fue del 20% a largo plazo (FIG. 6B; $p = 0,0068$).

Los receptores de células T $CD4^+$ despojadas de CD25 murieron de GVHD 1 semana a 10 días antes que los receptores de células $CD4^+$ enteras ($p = 0,024$). Ya que 10^5 células resultan en una GVHD rápida y altamente letal, el experimento se repitió con una dosis celular inferior ($0,5 \times 10^5$) en un intento de magnificar la diferencia en la supervivencia (FIG. 6B). Todos los receptores de $0,5 \times 10^5$ células T $CD4^+$ desprovistas de DD25 sucumbieron a la GVHD alrededor de 19 días después de la infusión de las células. Por ende, las células $CD25^+$ en el inóculo de células T del donante redujeron las respuestas de la GVHD, y la disminución del número de células $CD25^+$ en el inóculo de células T del donante aceleró la GVHD. Si bien el inicio de la GVHD fue más lento en receptores de células T $CD4^+$ enteras, la disminución del número de células $CD25^+$ del receptor pre-trasplante *in vivo* acelera la GVHD.

Efecto sobre GVHD usando células de médula o bazo despojadas de T de diversas cepas. En otra serie de experimentos, se irradiaron letalmente receptores BALB/c por rayos x el día anterior al trasplante con médula ósea despojada de células T alogénicas y o bien (i) 2×10^6 células T $CD4^+$ de ganglios linfáticos enteras o purificadas o de bazo enteras o (ii) 2×10^6 células $CD4^+$ despojadas de CD-25 (Véase, FIG. 7). Todos los receptores de células T $CD4^+$ despojadas de CD-25 murieron alrededor del día 63 después del trasplante (mediana de supervivencia = 35 días). En contraste, el 25% de los ratones que recibieron 2×10^6 células T $CD4^+$ enteras sobrevivieron hasta el día 100 (8 ratones/grupo; mediana de supervivencia = 91 días) (FIG. 7, $p = 0,016$).

El efecto de la disminución del número de CD25 sobre la generación de GVHD se ensayó en 3 combinaciones de cepas distintas, en donde la GVHD estuvo mediada por células T $CD4^+$ y $CD8^+$. Ratones BALB/c con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (adquiridos de los Institutos Nacionales de Salud de Bethesda, MD) no fueron irradiados, pero se les despojaron las NK por inyección intraperitoneal de 25 μ l de anti-asialo GM1 (Wako Chemicals USA, Inc. Richmond, VA) 2 y 4 días antes de la transferencia de células T alogénicas (ratones BALB/c SCID despojados de NK). Si se indica, las células $CD25^+$ de tipo donante se infundieron por inyección intravenosa separada.

En el primer modelo de GVHD, los ratones BALB/c SCID despojados de NK no irradiados recibieron células T enteras o células T despojadas de CD25 (FIG. 8). La disminución del número de CD25 de las células T resultó en una aceleración de la mortalidad por GVHD (FIG. 8, $p = 0,021$) indicando que las células $CD4^+CD25^+$ cumplen una función en la GVHD mediada por células T, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$ en ausencia de acondicionamiento de TBI.

En una segunda combinación de cepas, los ratones B10.BR letalmente irradiados (B10.BR ($H2^k$)) de The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) recibieron B6 BM y o bien 15×10^6 células de bazo B6 enteras o células B6 de bazo despojadas de CD-25 (FIG. 9). (Obsérvese que tanto B6 como bm12 (ambos $H2^b$) difieren en tres aminoácidos debido a mutaciones en la región de clase II IA). Los receptores de células de bazo despojadas de CD25 sucumbieron a la mortalidad por GVHD 10 días antes que los receptores de células de bazo enteras ($p = 0,055$).

En una tercera combinación de cepas, los ratones del receptor B6 fueron timectomizados antes del trasplante para prevenir el surgimiento de células reguladoras inmunitarias $CD4^+CD25^+$ derivadas de BM del donante después del trasplante. Adicionalmente, se administró mAb anti-CD25 (hibridoma 7D4) en una dosis de 0,5 mg por inyección intravenosa en el día -10, -7 y -4 en relación al día del trasplante (0,5 mg de anticuerpo por inyección) a estos receptores adultos timectomizados antes del trasplante para despojar las células reguladoras $CD4^+CD25^+$ del hospedante *in vivo*. Se purificó parcialmente anti-CD25 mAb con precipitación de sulfato de amonio de ascitis producida en ratones atímicos. Los ratones B6 timectomizados tratados con mAb anti-CD25 o mAb control se irradiaron letalmente y se trasplantaron con BM de BALB/c y 15×10^6 células de bazo enteras, y se vigiló la supervivencia (FIG. 10). Los ratones tratados con mAb anti-CD25 *in vivo* solamente antes del trasplante tuvieron una tasa de mediana de supervivencia significativamente inferior que los controles (22 frente a 44 días). Todos los receptores tratados mAb anti-CD25 sucumbieron a la mortalidad por GVHD alrededor de 28 días después del trasplante, es decir, 58 días antes que los receptores del anticuerpo control (FIG. 10, $p = 0,0063$).

Conjuntamente, estos datos indican que las células reguladoras inmunitarias $CD4^+CD25^+$ cumplen una función inhibitoria importante en la generación de GVHD, independientemente de la combinación de cepas o de si la GVHD es mediada por células T $CD4^+$ o por células T $CD4^+$ y $CD8^+$.

Ejemplo 7 - La infusión de células reguladoras inmunitarias $CD4^+CD25^+$ activadas y expandidas *ex vivo* mejora la GVHD.

Si bien los datos anteriores indicaron que las células $CD4^+CD25^+$ recién purificadas solamente tenían un efecto protector muy tenue sobre la GVHD cuando se administraban en una relación 1:1 con células $CD4^+$ enteras (Taylor *et al.*, 2001), se llegó a la hipótesis de que el efecto protector de la GVHD de las células $CD4^+CD25^+$ podría

ser clínicamente explotable para la inhibición de la letalidad por GVHD. Dado que las células CD4⁺CD25⁺ solamente ascienden a aproximadamente 5-10% de la población de CD4⁺ total, tanto en ratones como en seres humanos, la administración de cantidades suficientes de células reguladoras purificadas inmunes para tener un beneficio terapéutico significativo puede no ser clínicamente práctica. Sin embargo, ya que los datos indican que las células CD4⁺CD25⁺ pueden volverse células supresoras más potentes tras la activación, se llegó a la hipótesis de que la activación y expansión *ex vivo* de células CD4⁺CD25⁺ haría que la terapia celular reguladora inmunitaria fuese clínicamente factible. En consecuencia, para determinar inicialmente las condiciones de cultivo óptimas, se ensayaron 4 condiciones diferentes para activar las células CD25⁺ (es decir, Condiciones 1-4), y se evaluó el efecto de cada una, y los resultados se aplicaron al resto del experimento.

10 Condiciones de cultivo y activación *ex vivo* para células Treg.

Condición 1: Se realizaron intentos iniciales de incubación *ex vivo* de células CD4⁺CD25⁺ purificadas con mAb anti-CD3 soluble, células presentadoras de antígenos singénicos (APC), e IL-2 (100 U/ml) de alta dosis, como lo informan Thornton *et al.*, 2000. Las células CD25⁺ enriquecidas se suspendieron en una concentración final de 0,5 x 10⁶ células/ml en placas de 24 pocillos (Costar, Acton, MA) y se cultivaron durante 1 semana. El medio de cultivo fue DMEM (BioWhittaker, Walkersville, MD) enriquecido con 10% FBS (HyClone), 2-ME 50 mM (Sigma, St. Louis, MO), tampón HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM (Life Technologies, Grand Island, NY) y suplementos de aminoácidos (L-glutamina 1,5 mM, L-arginina y L-asparagina) (Sigma) y antibióticos (penicilina, 100 U/ml; estreptomina, 100 mg/ml) (Sigma). Inicialmente, se usaron anti-CD3 soluble (0,5 µg/ml) (hibridoma 145-2C11, IgG de hámster) (BD PharMingen) e IL-2 recombinante humana (5., ng/ml) (Amgen, Thousand Oaks, CA) para activar las células ("Condición 1").

No obstante, si bien las células activadas se expandieron 10 a 15 veces con este protocolo, su función supresora estuvo significativamente obstaculizada. Las células expandidas y activadas CD4⁺CD25⁺ no suprimieron la GVHD cuando se combinaron con cantidades equivalentes de células T CD4⁺ inductoras de GVHD nuevas (no se muestran los datos). Además, en contraste con las células T CD4⁺ recién aisladas, las células CD4⁺CD25⁻ control expandidas bajo el mismo protocolo de activación *ex vivo* no pudieron mediar la letalidad cuando se inyectaron en recipientes alogénicos, lo que indica que este protocolo de expansión y activación resultó en una pérdida general de la función *in vivo* (no se muestran los datos).

Condición 2: Luego, el protocolo de activación *ex vivo* de CD25⁺ se modificó usando las mismas condiciones de cultivo que anteriormente; pero en lugar de mAb anti-CD3 soluble, el protocolo modificado utilizó anti-CD3 inmovilizado (5,0 µg/ml y IL-2 (100 U/ml)) ("Condición 2"). Después de 3 días, las células se eliminaron de las placas recubiertas con anticuerpo, se transfirieron a placas nuevas y se alimentaron con medio que contenía IL-2 para permitir la re-expresión del receptor de células T (TCR). Luego se expandieron en medio que contenía IL-2 por 4 días más. Este protocolo resultó en una expansión de 15 a 20 veces de las células CD4⁺CD25⁺.

Las células CD25⁺ expandidas se evaluaron *in vivo* en ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID) C57BL/6 (B6) (H2^b), BALB/c (H2^d) y BALB/c (NIH) para su capacidad de inhibir la generación de GVHD. Se infundieron dos millones de células T B6 CD4⁺ recién purificadas en receptores SCID BALB/c despojados de NK no irradiados. Las cohortes de ratones recibieron una inyección separada de 2 x 10⁶ células CD4⁺CD25⁺ o células CD4⁺CD25⁻ activadas. Las células se activaron y expandieron con mAb anti-CD3 inmovilizado y una alta dosis de IL-2 durante 1 semana, y se vigilaron la supervivencia y los pesos (FIG. 11 y datos no exhibidos). La infusión de células CD25⁺ expandidas *ex vivo* aumentó significativamente el tiempo de la mediana de supervivencia de 10 días a 72 días (FIG. 11, p = 0,022). La supervivencia en ratones que recibieron células CD25⁻ expandidas complementarias no fue significativamente diferente de los ratones control que recibieron solamente células CD4⁺ nuevas (FIG. 11, p = 0,285), lo que indica que el efecto protector fue específico de la población de CD25⁺.

Si bien la administración de células CD25⁺ activadas y expandidas prolongó significativamente la supervivencia, los ratones experimentaron manifestaciones clínicas sustanciales de GVHD (20% adelgazamiento, diarrea, postura encorvada, escasa capa de pelo y eritema generalizado) y eventualmente murieron de GVHD. Estos datos indicaron que si bien las células CD25⁺ podrían expandirse considerablemente *ex vivo* para obtener cantidades suficientes como para inhibir significativamente la GVHD, fueron mejoras adicionales en el protocolo de activación y expansión para aumentar el efecto anti-GVHD.

50 Experimento comparativo: Para optimizar el método de activar y cultivar las células B6 CD25⁺, se compararon tres métodos distintos. El estándar para comparación fue el protocolo de activación de la Condición 2, lo que significa la activación vía (i) anti-CD3 inmovilizado y (ii) IL-2 de alta dosis (100 U/ml) como se describió precedentemente. Todos los cultivos fueron >95% viables.

Condición 3: Ya que el anticuerpo inmovilizado puede resultar en una fuerte señalización de TCR y en la muerte celular inducida por la activación (Lenardo, Nature 353:858-861 (1991); Wesselborg *et al.*, J. Immunol. 150:4338-4345 (1993); Lissy *et al.*, Immunity 8:57-65 (1998); Carpenter *et al.*, J. Immunol. 165:6205-6213 (2000)), existía la necesidad de ensayar un medio de activación menos potente y global. Por lo tanto, en la "Condición 3," se añadieron estimulantes esplénicos de BALB/c irradiados a células B6 CD25⁺ purificadas (en una relación 2:1), para inducir

niveles más fisiológicos de activación y señalización de TCR, y las células se cultivaron en presencia de IL-2 de alta dosis (100 U/ml).

Una parte importante de la evaluación de las condiciones de cultivo fueron los datos de recuperación, ya que la factibilidad clínica de este planteamiento dependió de poder infundir cantidades suficientes de células reguladoras CD25⁺ activadas. El protocolo de cultivo de la Condición 3, que utiliza anti-CD3 inmovilizado y IL-2 de alta dosis, resultó en 12 veces la expansión de las células en una semana, mientras que los estimulantes esplénicos de tipo hospedante, alogénicos para desencadenar la activación del receptor de células T y la IL-2 de alta dosis solamente llevaron a una expansión de las células de 1,5 veces.

Condición 4: Al reconocer que si bien podría requerirse una dosis relativamente alta de IL-2 para la expansión óptima, el retiro de IL-2 de alta dosis podría contribuir a una mala supervivencia celular tras la transferencia *in vivo*, de este modo resultando potencialmente en menos que la protección óptima contra GVHD, existió una razón más para ensayar la "Condición 4" (Lenardo, 1991). La Condición 4 utilizó estimulantes esplénicos de BALB/c irradiados e IL-2 de baja dosis (reducida a 10 U/ml), y se añadió el factor de crecimiento transformante humano recombinante β_2 (TGF- β_2 ; 1,0 ng/ml) (R&D Systems) como factor de crecimiento adicional para CD4⁺CD25⁺.

El método de la Condición 4, que utiliza estimulantes esplénicos alogénicos, IL-2 de baja dosis y TGF- β , produjo la más baja recuperación, con solamente 31% de las células aportadas recuperadas en la semana 1. Se evaluó la capacidad de los 3 tipos de células CD25⁺ cultivadas (CD4⁺; CD4⁺ + CD25 activadas; CD4⁺ + CD25⁺ activadas) de inhibir la GVHD mediada por células T CD4⁺ y CD8⁺ (FIG. 12). Seis ratones SCID BALB/c recibieron 10⁶ células T enteras despojadas de CD25 para inducir la GVHD. Dos cohortes separadas de ratones (6 ratones por grupo) también recibieron 10⁶ células CD25⁺ cultivadas bajo cada una de las primeras 2 condiciones (anti-CD3/IL-2 (Condición 2, se muestra como recuadros abiertos en la FIG. 12) o alo-APCs/IL-2 (Condición 3, se muestra como triángulos abiertos en la FIG. 12)). Una tercera cohorte (6 ratones por grupo) recibió 10⁶ células T enteras despojadas de CD25 y 0,5 x 10⁶ CD25⁺ células cultivadas con esplenocitos BALB/c irradiados, IL-2 de baja dosis y TGF- β (Condición 4, se muestra como asteriscos en la FIG. 12); sin embargo, la recuperación insuficiente en este grupo no permitió la infusión total de 10⁶ células CD25⁺.

Todos los receptores de células T CD25⁻ murieron dentro de los 8 días después de la transferencia de las células (FIG. 12). En contraste, la infusión de células CD25⁺ cultivadas inhibió significativamente la mortalidad de la GVHD más allá del protocolo de cultivo. Cincuenta por ciento (3/6) de los receptores de células T CD25⁻ nuevas y células CD25⁺ expandidas por mAb anti-CD3 inmovilizado e IL-2 de alta dosis se mantuvieron con vida 2 meses después de la transferencia de las células. La supervivencia se prolongó en receptores de células T CD25⁻ y células CD25⁺ cultivadas con esplenocitos de BALB/c y alta dosis de IL-2, pero todos los ratones murieron de GVHD alrededor del día 54 (la mediana de supervivencia fue 31 días) (FIG. 12). Todos los valores $p \leq 0,016$ se compararon con el grupo control (se muestra como círculos cerrados en la FIG. 12).

A pesar de la cantidad inferior de células infundidas, las células CD25⁺ cultivadas bajo este protocolo protegieron a 5 de 6 receptores contra letalidad por GVHD durante por lo menos 2 meses. Juntos, estos datos demuestran que las células CD4⁺CD25⁺ pueden expandirse fácilmente *ex vivo* en cantidades suficientes para proveer protección significativa contra GVHD rápidamente mortal.

Terapia de GVHD después del inicio de los síntomas de GVHD: Para determinar si la infusión de células Treg CD25⁺ activadas y expandidas podría usarse para tratar la GVHD, los receptores de B10.BR irradiados letalmente recibieron BM C57BL/6 sola o BM y esplenocitos en el día 0. En el día 6 post-BMT, momento en el cual hubo un claro inicio de los síntomas de GVHD, incluido el adelgazamiento inducido por GVHD en grupos que recibieron esplenocitos, indicativo de GVHD activa y en curso, se administró una sola infusión de células (anti-CD3/IL-2/TGF- β) C57BL/6 CD4⁺CD25⁺ activadas y expandidas por vía intravenosa. Se trasplantaron y analizaron 9-10 ratones por grupo. La infusión de células CD4⁺CD25⁺ expandidas y activadas pudo rescatar al 40% de los ratones a largo plazo (152 días) según lo comparado con la letalidad uniforme alrededor del día 51 en el grupo control ($P = 0,002$ en bazo + CD4/25 frente a bazo solo) (Véase la FIG. 13).

En consecuencia, de las terapias anti-GVHD ensayadas hasta la fecha, los métodos que utilizan infusiones de células Treg CD25⁺ activadas y expandidas parecen ser los más promisorios según lo evaluado por los presentes sistemas modelo.

Infusiones celulares múltiples para la prevención de GVHD: Además del efecto anti-GVHD demostrado al infundir células CD4⁺CD25⁺ activadas y expandidas en receptores SCID no irradiados de células T de donantes alogénicos, se observó un potente efecto anti-letalidad por GVHD en receptores B10.BR letalmente irradiados de esplenocitos C57BL/6 con distinta compatibilidad mayor de histiocitos total (distinto MHC) (15×10^6) junto con médula ósea (BM) despojada de células T C57BL/6. Las células (anti-CD3/IL-2/TGF- β) CD4⁺CD25⁺ activadas y cultivadas se infundieron en una cohorte de ratones, como se indica, el día 0 y el día 4 (10⁷/día) post-BMT en este sistema modelo (bazo + células CD4/25). Los controles consistieron en BM sola o BM y esplenocitos complementarios sin infusiones de células CD4/CD25. Se trasplantaron ocho ratones por grupo. Si bien se observó letalidad por GVHD uniforme en los animales control, los receptores de dos infusiones de células CD4⁺CD25⁺ exhibieron baja mortalidad, en donde el 88% sobrevivió a largo plazo (Véase la FIG. 14). Por consiguiente, estos datos indican que las múltiples infusiones

celulares no son tóxicas, no causan GVHD y de hecho, son altamente eficaces para prevenir la mortalidad por GVHD en receptores letalmente irradiados de injertos de donantes de distinto MHC total.

En consecuencia, ya que las células CD4⁺CD25⁺ pueden expandirse y administrarse como infusiones múltiples, estos datos proporcionan prueba de principio para ensayos de terapia de GVHD aguda y crónica en los que las múltiples infusiones celulares pueden administrarse a pacientes de un procedimiento de aislamiento de células CD4⁺CD25⁺ de un solo donante, de la destacada expansión observada con cultivo *ex vivo* activado de esta población celular que está presente en frecuencias relativamente bajas en seres humanos.

Efectos del injerto: Para ensayar la capacidad de facilitar el injerto de células C57BL/6 CD4⁺CD25⁺ expandidas, se usó anti-CD3/IL-2/TGF β o bien solo o con factores de supervivencia (IL-4; IL-7). Los receptores de BALB/c recibieron 4,25 Gy TBI y BM despojada de células T C57BL/6 (10⁷ células por receptor) junto con ninguna célula CD4⁺CD25⁺ o con células CD4⁺CD25⁺ activadas y expandidas (5x10⁶). Las células donantes promedio fueron: control (41%) en comparación con células CD4⁺CD25⁺: 89% (P = 0,0003) o 83% (P = 0,009), respectivamente, para los dos tipos de cultivos de expansión. El injerto fue de multi-linaje y estable con el transcurso del tiempo (se realizaron pruebas repetidas los días 82 y 139 con resultados similares). Los receptores no evidenciaron efectos colaterales (incluida GVHD), y la supervivencia fue comparable (~75% a largo plazo) en todos los grupos. Por lo tanto, los cultivos expandidos pueden facilitar el injerto.

Uso de células CD4⁺CD25⁺ activadas y expandidas para *L-selectina*:

Thorton *et al.*, 2000 describen que las células con alta *L-selectina* no son más potentes que las células con baja *L-selectina*, y más recientemente, Fu *et al.* report in Amer. J. Transplant 4:65-78, 2004 que no hay diferencia *in vivo* en la eficacia biológica de células CD4/25 recién aisladas con alta *L-selectina* frente a baja *L-selectina* para prevenir la gastritis autoinmunitaria tras la transferencia adoptiva *in vivo*.

De todas formas, para determinar si la expresión del receptor de direccionamiento influyó en los efectos anti-GVHD de células CD4⁺CD25⁺ activadas y expandidas, se cultivaron células C57BL/6 CD4⁺CD25⁺ usando esferas recubiertas con anti-CD3 + anti-CD28 mAb (2 días) + IL-2 (100 U/ml). Después de 7 días, las células activadas y expandidas se enriquecieron para niveles altos (hi) o bajos (lo) de *L-selectina* (CD62L) de expresión por purificación en columna. Doce bm de ratones letalmente irradiados (C.H2bm12 (B10.BR (H2^k))) recibieron BM sola despojada de células T C57BL/6 de distinto MHC de clase II o con células T C57BL/6 CD4⁺CD25⁻ complementarias (10⁶ células por receptor). A algunas cohortes de receptores que recibieron células T de donantes se les administraron células CD4⁺CD25⁺CD62L-hi o CD4⁺CD25⁺CD62L-lo activadas y expandidas *ex vivo* (3x10⁶ células por receptor). Los controles consistieron en BM sola (BM) o BM con células C57BL/6 CD4⁺CD25⁻ solas (BM + células CD4⁺CD25⁻). Se trasplantaron ocho ratones por grupo. A partir del día 35 post-BMT, los controles que recibieron células T CD4⁺CD25⁻ de donantes sin células CD4⁺CD25⁺ exhibieron una tasa de supervivencia de tan solo 25%. Los receptores que recibieron células CD4⁺CD25⁺CD62L-lo tuvieron una tasa de supervivencia de 38%, lo que no fue significativamente diferente (P = 0,35) de aquellos que recibieron esta población de células complementaria.

En notable contraste, los receptores que recibieron células CD4⁺CD25⁺CD62L-hi aisladas después de la activación y el cultivo *ex vivo* exhibieron una tasa de supervivencia significativamente mayor (100%) en comparación con aquellos que no recibieron células CD4⁺CD25⁺ complementarias (P = 0,0016) o con aquellos que recibieron células CD4⁺CD25⁺CD62L-lo (P = 0,005). Por consiguiente, existe un beneficio importante de la infusión *in vivo* de células CD4/25 con alta *L-selectina* frente a baja *L-selectina* que han sido expandidas con esferas CD3/28 + IL-2 en la supresión de la letalidad por GVHD. Estos datos confirman también que las células activadas y cultivadas *ex vivo* pueden subdividirse en subconjuntos de células que contienen potentes efectos anti-GVHD en roedores, y que este procedimiento, realizado después de la activación y expansión *ex vivo*, puede además mejorar las propiedades biológicas de esta población de células en modelos de BMT. Los niveles de expresión de CD62L proporcionan uno de dichos planteamientos para lograr esta meta, pero se conocen otros u otros se definirán en la técnica.

Los presentes datos prueban que las células CD4⁺CD25⁺ activadas y expandidas *ex vivo* proporcionan supresión y/o inhibición potente de GVHD, además de efectos promotores de injerto, cuando se infunden en receptores alogénicos usando una diversidad de modelos. Los estudios en células humanas han demostrado el fenómeno *in vitro* de que las células CD4⁺CD25⁺ pueden activarse y expandirse, y simultáneamente retener la capacidad de supresión para los aloantígenos.

Ejemplo 8 - Métodos para expandir en cultivo *ex vivo* células Treg rigurosamente aisladas, y células provistas de ese modo para uso en terapias inmunosupresoras en seres humanos.

En base a los estudios en ratones precedentes y a estudios anteriores, como lo describen Taylor *et al.*, 2002, *supra*, se demuestra en este documento que las células Treg expandidas en forma policlonal *ex vivo*, con anti-CD3 más IL-2 (durante 10 días), son eficaces para prevenir la GVHD. Los estudios de otros autores han demostrado que la expansión *ex vivo* de células Treg con APC irradiadas alogénicas más IL-2 exógena puede suprimir la GVHD (Cohen *et al.*, 2002, *supra*; Trenado *et al.*, 2002, *supra*), mientras que estudios subsiguientes han demostrado que las células Treg pueden prevenir la GVHD, pero que en modelos animales todavía permiten los efectos antitumorales o de la leucemia contra hospedante (GVL) (Trenado *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2003; Edinger *et al.*, 2003, *supra*). No

obstante, claramente, la función potencial de las células Treg humanas de la terapia inmunosupresora clínica en trasplante humano, fue limitada a menos que, y hasta que, se pudieron desarrollar métodos mediante los cuales las células Treg humanas se aislaron y expandieron en cultivo durante un largo periodo, suficiente para proveer cantidades suficientes de células para infusión *in vivo*.

5 Para satisfacer esta necesidad, aprovechando los mecanismos fisiológicos naturales para reducir respuestas inmunitarias, los inventores han desarrollado métodos de purificación únicos y técnicas de expansión en cultivo *ex vivo* que proporcionan células T supresoras CD25⁺ humanas activadas para terapias inmunosupresoras, particularmente para la prevención de reacciones inmunitarias relacionadas con trasplantes. En los siguientes ejemplos, se generaron líneas celulares supresoras humanas que mantuvieron la función durante por lo menos 3-6
10 semanas. En algunos casos, las líneas celulares en cultivo permanecieron funcionales por hasta 3 meses y fueron incluso potentemente supresoras. No obstante, para caracterizar mejor la función de las células Treg CD4⁺CD25⁺, se desarrolló un método de purificación MACS modificado a fin de aislar y expandir en cultivo estas importantes células. Se utilizaron los siguientes componentes y métodos en los experimentos descritos a continuación, que resultan en las potentes células Treg expandidas en cultivo, capaces de proveer un destacado efecto supresor para
15 propósitos terapéuticos.

Purificación MACS de subconjuntos de células T CD4⁺. Se aislaron células T de preparaciones con recubrimiento leucocitario derivadas de sangre completa de donantes voluntarios sanos normales (Memorial Blood Centers, Mineápolis, MN) (también se utilizaron productos de leucoféresis en algunos experimentos incipientes). Las células recubiertas con recubrimiento leucocitario se centrifugaron en capas ficoll-hypaque para recoger las PBMC. Se
20 aislaron células brillantes CD25⁺ por selección positiva de PBMC con microesferas magnéticas anti-CD25 directamente conjugadas (2 µl por 10⁷ células) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), y se purificaron sobre una columna LS⁺ (columnas de separación LS⁺ y el instrumento de unidad de separación MidiMACS son comercializados por Miltenyi Biotec). Las células se aplicaron luego a una segunda columna magnética, se lavaron y se volvieron a eluir. Después del procedimiento en doble columna, las células fueron >93% puras como habitualmente (para CD25)
25 según análisis FACS (unas pocas células B (4-8%) y células T CD8+ (~1%) constituyeron el resto).

En forma alternativa, las células se tiñeron indirectamente con anti-CD25-FITC, clon 2A3 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA), se lavaron y unieron a microesferas de multclasificación anti-FITC (3 microlitros por 10⁷ células, Miltenyi Biotec) y se seleccionaron positivamente. Al igual que con el sistema de microesferas directo, las células se volvieron a aplicar a una segunda columna. Después de la purificación en la
30 columna, se separaron las esferas de multclasificación, y se despojó a las células CD25⁺ de células que expresaban CD8, CD14, CD19, CD20 y CD56 con un cóctel de microesferas recubiertas con mAb para la supresión del linaje.

La fracción sin CD25 de PBMC se despojó incluso más de las células CD25⁺ con más microesferas anti-CD25 (10 microlitros por 10⁷ células). Las células T CD4⁺ se aislaron luego de la fracción de CD25- por selección positiva con microesferas magnéticas recubiertas con mAb anti-CD4 (10 microlitros por 10⁷ células) (Miltenyi Biotec). Las células
35 fueron habitualmente 96-98% CD4⁺CD25⁻ puras según el análisis FACS.

Cultivo de células T. Se cultivaron células CD4⁺CD25⁺ o células CD4⁺CD25⁻ control aisladas con Dynabeads recubierto con mAb anti-CD3/CD28 (U. Pensilvania) (Levine et al., J. Immunol. 159(12):5921-5930 (1997), Laport et al., Blood 102(6):2004-2013 (2003)) en una relación (2:1) esfera/célula total. Las células alimentadoras CD4⁺CD25⁻ se irradiaron a 30 Gy y se añadieron en una relación 1:1 a las células CD4⁺CD25⁺. Las células se cultivaron a 1
40 millón de células (no irradiadas)/ml en placas de 24 pocillos. Se añadió IL-2 en el día 3 a 50 IU/ml (Chiron, Emeryville, CA). Las células se dividieron según fue necesario, aproximadamente 1:3 cada 3 días durante la fase de desarrollo rápido. El medio de cultivo fue RPMI-1640 (Gibco) enriquecido con 10% FCS (Gibco), L-glutamina, penicilina y estreptomina.

Células simuladoras para cultivos *MLR*. Se generaron células dendríticas (DC) humanas inmaduras a partir de monocitos CD14⁺ (Sallusto et al., J. Exp. Med. 179(4):1109-1118 (1994), Banchereau et al., Annu. Rev. Immunol. 18:767-811 (2000)), aislados de PBMC, por purificación basada en esferas magnéticas (Miltenyi-Biotec) y se cultivaron en medio X-Vivo-15 (BioWhittaker, Walkersville, MD) a 10⁶ células por ml enriquecido con GMCSF (50 ng/ml final) e IL4 (20 ng/ml final) citocinas de (R&D Systems, Mineápolis, MN). Las células se cultivaron durante 5-10
45 días antes del uso como estimuladoras en *MLR*.

Para algunos experimentos, las DC se maduraron con TNF-alfa (20 ng/ml final) y Poly I:C, un ligando agonista de agentes del receptor de tipo Toll (TLR) 3 (20 µg/ml final) (Sigma, St. Louis, MO) durante dos días (Cella et al., J. Exp. Med. 189(5):821-829 (1999), Spisek et al., Cancer Immunol. Immunother. 50(8):417-427 (2001), Godfrey et al., Blood 103:1158-1165 (2004)). En otros experimentos, se añadieron TNF y PolyI:C (en las mismas concentraciones) o LPS (Sigma-Aldrich) (10-100-1000 ng/ml) directamente a *MLR*. Los estimulantes de DC se irradiaron a 30 Gy.

55 Cultivo de ensayo de *MLR*. Se cultivaron 5x10⁴ células T CD4⁺CD25⁻ respondedoras y 5x10³ APC estimuladoras de DC por pocillo, en placas de 96 pocillos con fondos en U. Las líneas de células T supresoras o convencionales cultivadas para ensayo se añadieron a 2,5x10⁴ por pocillo para ensayos estándar, o en cantidades graduales para experimentos de titulación. Para experimentos de bloqueo de anticuerpos, se usaron 1x10⁴ células supresoras. El medio de cultivo fue RPMI-1640 (Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY) enriquecido con 10% FCS (Gibco), L-

glutamina, penicilina y estreptomina. Los pocillos se pulsaron en los días 3, 5, 6 y 7 con ^3H -timidina durante las últimas 16 horas de cultivo. Todos los puntos de tiempo tuvieron 6 réplicas. Los resultados se expresaron en recuentos por minuto. Sin embargo, los datos se recopilaron con un contador beta directo, en consecuencia los cpm reportados fueron inferiores a los habitualmente reportados con ampliación de centelleo de líquidos. Por consiguiente, si bien la magnitud absoluta de los recuentos es inferior, las diferencias comparativas entre las muestras experimentales siguieron siendo las mismas.

Análisis de citocinas. Los sobrenadantes del cultivo se centrifugaron libres de células y se congelaron alícuotas a -80°C . Los sobrenadantes se evaluaron por el sistema de ensayo Luminex con un sistema de múltiples analitos basado en esferas (R&D Systems, Mineápolis, MN).

Citotoxicidad. Las líneas celulares supresoras cultivadas se ensayaron para citotoxicidad contra DC alogénicas o contra la línea celular sensible a NK, K562, en ensayos de liberación ^{51}Cr de 4 horas. Las relaciones efector a diana oscilaron entre 20:1 y 0.6:1. Las células diana se marcaron con 200 μCi cromato sódico- ^{51}Cr (DuPont, Wilmington, DE) durante 60 minutos. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, y se determinó el porcentaje de lisis. Se obtuvieron células positivas NK92 líticas control provenientes de ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) y se mantuvieron en presencia de 500 U/ml IL-2 humana recombinante (Chiron).

Anticuerpos monoclonales (*Mab*). Para seguir con la purificación, las células se tiñeron con anti-CD25-PE, no bloqueado por microesferas anti-CD25, el clon M-A251 (BD Pharmingen). Otros anticuerpos para citometría de flujo incluyeron anti-CD4-PerCP (clon SK3), anti-CD8-PerCP (SK1), anti-CD19-APC (4G7) de (Becton Dickinson Immunocytometry Systems); anti-CD27-FITC (MT271), anti-CD62L-PE (Dreg 56), anti-CD69-FITC (FN50), anti-CD152-PE (BNI3), anti-CD122-PE (Mik-b2), anti-CD132-PE (AG184) y anti-CD 134 (ACT35) de (BD Pharmingen); y anti-CCR7-PE (#150503), y anti-GITR-PE (#110416), de (R&D Systems). En experimentos funcionales destinados a bloquear la supresión, los anticuerpos neutralizantes se usaron en cantidades tituladas de hasta 20 $\mu\text{g/ml}$. Los anticuerpos incluyeron anti-IL-10 (23738), anti-IL-10-Receptor-alfa (37607) y anti-TGF β -1,2,3 (1D11), de (R&D Systems).

Citometría de flujo. Para tinción por inmunofluorescencia, las células se tiñeron durante 30 min a 4°C , con cantidad titulada de cada anticuerpo. Las células se lavaron nuevamente y se analizaron en un medidor de citometría de flujo FACS Calibur (BD Immunocytometry Systems). Los subconjuntos de líneas celulares se clasificaron en un aparato FACS Vantage. Los datos se analizaron con el software FloJo versión 4.4 (Treestar, Ashland, OR). La tinción intracelular se realizó usando células fijadas con paraformaldehído, 2% a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguida de permeabilización y tinción durante 1 hora, y lavado en un tampón que contiene saponina al 0,1%, PBS más 5% FCS-5% AB de suero humana.

Estadísticas. Todas las barras de errores en las FIG. 15-21 representan una desviación estándar encima y debajo de la media. Se usó la prueba t de Students de dos colas para determinar la significancia estadística de las diferencias entre las respuestas proliferativas. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Resultados experimentales. El uso de una titulación inferior de microesferas recubiertas con mAb anti-CD25 en la presente purificación MACS modificada llevó al aislamiento de células con mayor intensidad fluorescente de los canales media de expresión de CD25. A su vez, la replicación de las células magnéticamente aisladas a una segunda columna para purificación adicional también aumentó el enriquecimiento de las células CD25 $^+$. El uso de microesferas escindibles permitió la remoción de esferas después de la purificación de CD25, lo que luego permitió la subsiguiente reducción en el número del linaje (de células CD8, CD14, CD19 y CD56). Esta estrategia condujo a la generación de poblaciones de células CD4 $^+$ CD25 $^+$ altamente purificadas (FIG. 15C). La fracción negativa CD25 de las células también se despojó de células CD25 $^+$, y se usó como la fuente de purificación de las células CD4 $^+$ CD25 $^+$, para aislamiento de controles de células T convencionales (FIG. 15D).

Las esferas anti-CD3/CD28 y la IL-2 facilitan la expansión de células Treg. Las células Treg CD4 $^+$ CD25 $^+$ humanas son hiposensibles a la estimulación con mAb anti-CD3 o DC. Sin embargo, pueden proliferar cuando se exponen a estos estímulos más IL-2 o IL-15, aunque hasta un grado muy inferior que las células T CD4 $^+$ CD25 $^-$ (Jonuleit *et al.*, 2001, *supra*, Dieckmann *et al.*, 2001, *supra*). Por consiguiente, en los experimentos iniciales, las células CD4 $^+$ CD25 $^+$ purificadas se expandieron con anti-CD3 inmovilizado más IL-2, lo cual permitió una expansión de 5-10 veces en dos semanas.

Para aumentar incluso más el potencial de expansión, se investigó una estimulación basada en una molécula coestimuladora. Para esto, se usaron Dynabeads de tamaño celular con mAb anti-CD3 y anti-CD28 covalentemente unido (3/28 esferas). Este reactivo se ha utilizado exitosamente para expansión a escala clínica de células T convencionales para ensayos de inmunoterapia (Levine *et al.*, 1997, Laport *et al.*, 2003), y ha permitido una expansión de las células T de más de 1 millón de veces. Drásticamente, no obstante, se descubrió que las células Treg CD25 $^+$ rigurosamente purificadas proliferaron de manera deficiente con la estimulación con las esferas 3/28 solas. Esto contrasta con la respuesta vigorosa generada por las células CD4 $^+$ CD25 $^-$ (FIG. 16A). La débil respuesta de las células CD4 $^+$ CD25 $^+$, no obstante, se aumentó significativamente con el enriquecimiento de IL-2, y esta combinación fue suficiente para la expansión de Treg más modesta de la mayoría de los donantes (FIG. 16B). De

todos modos, cuanto más rigurosamente se purificaron las células $CD4^+CD25^+$, peor crecieron en cultivo, incluso con estimulación con esferas 3/28 e IL-2.

Dado que las células $CD4^+CD25^+$ parecen tener defectos de producción de citocinas, se llegó a la conclusión de que las células T convencionales podrían complementar esta deficiencia y proporcionar un aumento de la expansión. En consecuencia, se añadieron células alimentadoras $CD4^+CD25^-$ irradiadas a cultivos de Treg estimuladas con esferas 3/28 al inicio (relación 1:1), y se descubrió que proporcionaban un incremento sostenido en la respuesta proliferativa (FIG. 16B). Este aumento fue significativamente mayor que aquel con IL-2 sola a 100 IU/ml. Cabe destacar, que el enriquecimiento de cultivos Treg con medio condicionado (20% v/v) (derivado de células T $CD4^+CD25^-$ convencionales activadas en el día 5 después de la estimulación con esferas 3/28), podría en gran medida (pero no completamente) reproducir los efectos de las células alimentadoras. Esto sugirió que las células T convencionales activadas producen factores de crecimiento solubles para la expansión de células $CD4^+CD25^+$ (principalmente IL-2, pero posiblemente otros factores). Cabe destacar que estas líneas celulares enriquecidas con células alimentadoras mantuvieron una potente función supresora. Por lo tanto, con el uso de esferas 3/28, IL-2 y células alimentadoras $CD4^+CD25^-$, las líneas celulares derivadas de $CD4^+CD25^+$ exhibieron un crecimiento significativo, y se obtuvo fácilmente una expansión de más de 100 veces.

La expansión ocurrió como una curva de crecimiento sigmoide clásica, comenzando lentamente, expandiéndose rápidamente en 1-2 semanas y luego alcanzando una fase de meseta (FIG. 16C). Después de alcanzar una fase meseta del crecimiento, las líneas celulares se mantuvieron en IL-2, y se sostuvo la función supresora durante 3-6 semanas. En algunos casos, las líneas celulares en cultivo de hasta 3 meses tuvieron una actividad supresora potente, típicamente la función supresora disminuyó con el tiempo (no se muestra).

Evaluación funcional de $CD4^+CD25^+$ Líneas celulares supresoras en ensayos de MLR. Todas las líneas celulares fueron inicialmente evaluadas para actividad supresora en MLR después de 2-3 semanas de cultivo, y luego se analizaron más detalladamente durante las siguientes 3-4 semanas. Para evaluar la función supresora, se utilizó un ensayo de alo-MLR con incompatibilidad de HLA como una lectura funcional. Las células T respondedoras $CD4^+CD25^-$ aisladas recién purificadas se sometieron a reacción con DC inmaduras irradiadas de donantes no relacionados. Las células de ensayo (líneas celulares derivadas de $CD4^+CD25^+$ y $CD4^+CD25^-$ cultivadas) se añadieron a la MLR en el día 0 con una relación reguladora/respondedora de (1:2). La supresión se reflejó por la disminución de la proliferación, y fue más evidente en el día 6-7, pico de la MLR control. Estos ensayos son muy robustos y consistentes entre los donantes, y por lo tanto fueron útiles como la medida estándar actual de supresión.

La mayoría de las líneas celulares derivadas de células $CD4^+CD25^+$ (19 de 25,76%) tuvieron una función supresora clara (>65% de inhibición de la proliferación) en una relación supresora/respondedora de 1:2 (FIG. 17A). En contraste, se halló que las líneas celulares derivadas de células $CD4^+CD25^-$ aumentan invariablemente la MLR (FIG. 17A). El resto de las líneas celulares derivadas de $CD4^+CD25^+$ (6 de 25,24%), tuvieron una función supresora débil (20-65% de inhibición de la proliferación). No obstante, ninguna aumentó la MLR (FIG. 17B). Coherente con las observaciones anteriores (Jonuleit *et al.*, 2001, *supra*), las células $CD4^+CD25^+$ purificadas por MACS recién aisladas tienen solamente actividad supresora más modesta en estos ensayos de MLR, equivalente a las líneas celulares supresoras débiles (20-65% de inhibición de la proliferación) (FIG. 17B). Cabe destacar que 9 de 19, 47% de las líneas celulares supresoras tuvieron actividad supresora potente, y estas líneas celulares inhiben casi por completo los cultivos de MLR (>90% de inhibición de la proliferación) (FIG. 3C). El nivel de actividad supresora fue una característica intrínseca de cada línea, en el sentido que las líneas celulares supresoras débiles o potentes tuvieron actividad consistentemente similar cuando se ensayaron en experimentos de MLR independientes múltiples a lo largo de varias semanas de análisis (véase a continuación).

Caracterización de líneas celulares $CD4^+CD25^+$ y $CD4^+CD25^-$. Se cultivaron líneas celulares supresoras potentes en paralelo con líneas celulares derivadas de $CD4^+CD25^-$ del mismo individuo, que cumplieron la función de controles de células T convencionales. Las líneas celulares débilmente supresoras también se caracterizaron y compararon para determinar las características frente a las líneas celulares potentemente supresoras. Cabe destacar que a menudo fue posible pronosticar la función supresora simplemente en base a características de crecimiento en cultivo, en donde las líneas $CD4^+CD25^+$ que crecieron más rápidamente tuvieron la función menos supresora (no se muestra).

Todas las líneas celulares expresaron inicialmente algún fenotipo de células T activado típico después de la estimulación con las esferas 3/28. Las líneas celulares expresaron transitoriamente cantidades relativamente equivalentes de antígenos de activación, que rápidamente disminuyeron a lo largo de 2-3 semanas después de la activación. Estos incluyen CD122, CD132, GITR (receptor de TND inducido por glucocorticoides), OX40 (CD134) y CTLA4 de la superficie celular (CD152). No obstante, después de varias semanas de cultivo, cuando las células se tornaron relativamente quiescentes (mantenidas en IL-2), los fenotipos se volvieron claramente divergentes. En comparación con las líneas de células T derivadas de células $CD25^-$, las líneas celulares Treg fuertemente supresoras expresaron niveles más altos de CD25, y se sostuvo la expresión elevada. Se muestran los niveles después de 3 semanas de cultivo (MFI 22 frente a 210) (FIG. 18A18B). MFI hace referencia a la intensidad fluorescente media. Asimismo, la tinción intracelular para CTLA4 demostró una expresión potenciada en las líneas celulares supresoras (MFI 8 frente a 64) (FIG. 18D, 18E). Las diferencias en expresión de CD25 y CTLA4 intracelular fueron las características fenotípicas más distintivas identificadas en nuestros estudios, que distinguen

las líneas celulares convencionales de las derivadas de CD25⁺. Las líneas celulares débilmente supresoras expresaron cantidades intermedias de estos dos antígenos descriptivos clave (FIG. 18C, 18F).

Para determinar otras diferencias entre las líneas celulares débilmente y potentemente supresoras, se emprendió otro análisis de antígenos de superficie celular. Se registró una correlación de 3 antígenos (CD62L, CCR7 y CD27) que se expresaron en un porcentaje mayor de células en las líneas celulares supresoras potentes en comparación con las líneas débiles (FIG. 18G, 18H, 18I). Para evaluar más la relevancia funcional, se usaron esferas magnéticas para aislar las células CD62L⁺ o CD27⁺ (los dos antígenos más brillantes), y se halló enriquecimiento para la actividad supresora en ambos subconjuntos positivos (no se muestra). Para determinar más definitivamente la función de estos subconjuntos de líneas celulares, las líneas celulares se clasificaron para células CD62L⁺/CD27⁺, CD62L⁺/CD27⁻ CD62L⁻/CD27⁺ (FIG. 18J) y cada población se ensayó para actividad supresora en MLR.

La función supresora tuvo lugar únicamente dentro del subconjunto CD62L⁺/CD27⁺. En contraste, se halló que los otros subconjuntos aumentan la MLR (FIG. 18K). Por ende, las líneas celulares CD4⁺CD25⁺ pueden contener mezclas de células supresoras y no supresoras, y los efectos supresores pueden ser dominantes frente a los efectos de aumento de las células no supresoras. La expresión conjunta de CD62L y CD27 se puede emplear para distinguir estos subconjuntos, y facilita la selección de líneas celulares (o subconjuntos de líneas celulares) con potente potencial supresor.

Caracterización de la función de las células supresoras en ensayos de MLR. Para determinar el mecanismo celular de supresión en los ensayos de MLR, se seleccionaron líneas celulares potentes (>90% de supresión de MLR en el día 6) para posterior análisis. Primero se mostraron consistentemente supresoras y luego se titularon para determinar la cantidad mínima requerida para la supresión potente. Para determinar qué tan ampliamente reactivas son las células Treg cultivadas, se ensayaron varias líneas independientes para supresión en 8 cultivos separados de MLR con incompatibilidad de HLA. En todos los casos, las células Treg cultivadas suprimieron marcadamente todos los cultivos de MLR analizados (FIG. 19A). Si bien hubo cierta variación en la magnitud de la supresión (media de 92%, intervalo 81-98%, n=16), las líneas celulares Treg potentes fueron eficaces para inhibir prácticamente todos los cultivos de MLR.

Para cuantificar la cantidad mínima de células supresoras requeridas para la inhibición potente, cantidades tituladas de células supresoras se añadieron a los cultivos de MLR indicadores. Las curvas de titulación (FIG. 19B) revelaron un punto de ruptura aproximado en una relación supresora a respondedora de menos de 1:10 (5.000 supresoras a 50.000 respondedoras). Se halló que las curvas de titulación fueron no lineales, posiblemente indicando efectos colaboradores en la invalidación de la supresión con dosis bajas de células Treg. La proliferación estuvo casi completamente obstaculizada en la MLR suprimida en todos los puntos de tiempo, indicando que los efectos supresores ocurren dentro de los primeros tres días, es decir, antes de la explosión proliferativa en MLR. Para evaluar efectos más tempranos y buscar la potencial desviación de células reguladoras de la calidad de respuesta inmunitaria, se evaluó el contenido de citocinas de sobrenadantes de MLR. Hubo una profunda supresión de la acumulación de citocinas. La MLR suprimida hace una pequeña ola temprana mínimamente detectable de IL-2 (en el umbral de sensibilidad del ensayo), sin producción tardía detectable (FIG. 19C). Dado que la MLR control manifestó acumulación de IL-2 en el sobrenadante, incluso un día después del inicio del cultivo, el efecto supresor fue detectable y casi profundo tan pronto como el primer día de la supresión de MLR. Además, la acumulación de citocinas tardías (picos típicamente en el día 5-7), tales como TNF- α , IFN- γ , GM-CSF y IL-6, se previno prácticamente por completo a lo largo de todo el cultivo (FIG. 19D). Cuando los sobrenadantes de citocinas se analizaron en un dispositivo Luminex, en donde pequeños volúmenes (50-100 μ l) bastan para ensayar múltiples citocinas al mismo tiempo, no hubo inducción de IL-4 o IL-10 para indicar la desviación hacia un tipo regulador de diferenciación de TH2 o T1 (IL-10 que produce Tr1). De hecho, la acumulación de IL-10 también se previno.

Para examinar la reactividad de las células T respondedoras temprano en la MLR, las células se ensayaron por citometría de flujo para expresión del marcador de activación. Usando células respondedoras derivadas de donantes positivos HLAA2, y células supresoras de un donante negativo HLA-A2, las células respondedoras pudieron distinguirse durante el co-cultivo. Las células MLR control y suprimidas se evaluaron 24 o 48 horas después del inicio del cultivo para inducción de CD69, CD25 y OX40 (CD134). En la MLR control, el 2-4% de las células T respondedoras demostró expresión de estos antígenos de activación (FIG. 20A-C), coincidente con la frecuencia de células T alorreactiva esperada para MLR incompatible con HLA. Notablemente, en la MLR suprimida, muy pocas células T respondedoras demostraron expresión de estos antígenos de activación (FIG. 20D-F). Estos datos demuestran también un bloqueo muy temprano de la activación de las células T como mecanismo de la acción de las células Treg.

La potencia de supresión se retuvo notablemente si las DC que estimulaban a la MLR estaban activadas o maduras. La maduración/activación de DC con lipopolisacárido (LPS), un ligando de TLR4, o la combinación del factor de necrosis tumoral/polyIC, un ligando de TLR 3 análogo de ARN bicatenario) (Spisek *et al.*, 2001, *supra*; Godfrey *et al.*, 2004, *supra*), no llevó a eludir la supresión (FIG. 20G). La inclusión de LPS o TNF/Poly IC en el cultivo de MLR tampoco eludió la supresión. Por ende, las células Treg humanas cultivadas fueron muy potentes, y las DC activadas, que expresan abundantes moléculas y citocinas coestimuladoras, no pudieron eludir su efecto supresor.

La inhibición potente y temprana de MLR sugiere la inactivación o eliminación de las APC como un posible mecanismo de supresión. Sin embargo, por evaluación microscópica, las DC parecen persistir a lo largo de la duración del cultivo. A su vez, las líneas celulares supresoras no tuvieron citotoxicidad para DC alogénicas (FIG. 21A) o dianas sensibles de rNK/LAK (K562) (FIG. 21B) en ensayos de liberación de cromo.

5 Para determinar si factores inmunosupresores conocidos estaban mediando la acción de las células Treg cultivadas, se añadieron a los cultivos de MLR control y suprimidos, anticuerpos capaces de neutralizar IL-10 o TGF- β . Dada la potencia del efecto supresor, se añadieron cantidades inferiores de supresores para hacer que el ensayo fuera más sensible a la inversión de la supresión. A pesar de esta reducción, los anticuerpos reactivos con IL-10, IL-10R-alfa, o TGF- β ₁₂₃, no pudieron revertir la supresión, y la inclusión de los tres anticuerpos juntos tuvo un efecto muy modesto (FIG. 21C). Se ensayaron dosis de 1, 10 o 20 microgramos por ml, en donde los efectos se observaron solamente con los niveles de dosis más altos.

A su vez, se llevaron a cabo estudios trans-pocillos para determinar si los factores solubles liberados por las células Treg podrían impartir supresión. Las células de MLR indicadoras se cultivaron encima de células Treg en reposo o activadas o en cultivos de MLR suprimidas, separadas por membranas con poros de 0,4 micrómetros. No se halló que ningún efecto supresor atravesara la membrana (no se muestra). Cabe destacar que cuando las células Treg cultivadas se añadieron a alo-MLR promovidas por APC derivadas del mismo donante que las supresoras, pero aún alogénicas a las células T respondedoras, se observó una supresión mínima (FIG. 21D). Por tanto, cuando las células Treg cultivadas, derivadas de un Donante A, se añaden a una alo-MLR promovida por las DC del mismo Donante A, hay supresión mínima. No obstante, las mismas células Treg, cuando se añaden a una MLR promovida por DC de un Donante B, producen supresión. Estos resultados indican que las células Treg cultivadas no son constitutivamente supresoras de todas las MLR. Las células Treg cultivadas necesitan alguna forma de estimulación adicional específica que puede ser aportada por alo-DC (y no por las DC autólogas).

En síntesis, este ejemplo demuestra que las células supresoras pueden aislarse y expandirse en cultivo de sangre humana. Notablemente, estas células Treg cultivadas pueden expandirse 100 veces, y cuando son puras, pueden expresar actividad supresora fortalecida y potente. De hecho, la función supresora de estas células en ensayos de MLR demostró bloquear casi por completo la MLR incompatible con HLA. Asimismo, estas células supresoras expandidas en cultivo tienen muchas de las características distintivas de las células Treg CD4⁺CD25⁺ recién aisladas. Expresan altamente CD25 y CTLA4 citoplásmica, su actividad depende del contacto de una célula con otra, y la supresión no parece depender de la actividad citolítica ni de las citocinas inmunosupresoras de IL-10 o TGF β .

Además, estos datos son los primeros en demostrar la factibilidad de un planteamiento basado en esferas recubiertas de mAb anti-CD3/28 para la activación y expansión de las células Treg. Las líneas celulares supresoras no responden en forma proliferativa en co-cultivos directos con las DC. Cuando se combina anti-CD28 con mAb anti-CD3, se produce una estrategia de expansión más eficiente. A pesar de la activación basada en esferas recubiertas con mAb anti-CD3/CD28 y enriquecida con IL-2, las células CD4⁺CD25⁺ rigurosamente purificadas (o células CD4⁺CD25⁺ brillantes clasificadas con FACS) no crecieron bien. El crecimiento fue mejor con la adición de alimentadoras CD4⁺CD25⁺, que proporcionan IL-2 y otros factores de crecimiento. El crecimiento y la función supresora de la línea celular CD4⁺CD25⁺ fueron variables e inversamente correlacionados, posiblemente debido a que las líneas celulares con función supresora deficiente resultaron de la inclusión de pequeñas cantidades de células T convencionales en los cultivos de CD4⁺CD25⁺. Las líneas celulares derivadas de células más rigurosamente purificadas no crecieron tan bien, pero fueron supresoras más potentes. Además, el inmunofenotipo de las líneas celulares débilmente supresoras (CD25 moderado, y CD62L o CD27 dividido) fue consistente con una población mixta de células convencionales y supresoras. No obstante, cabe destacar que después del cultivo, las células supresoras funcionalmente activas estuvieron exclusivamente dentro de la población que expresa CD62L y CD27, y las líneas supresoras potentes expresaron casi uniformemente estos antígenos.

Notablemente, la función efectora supresora de las células CD4⁺CD25⁺ no está restringida por MHC, y las células supresoras obstaculizan las respuestas de prácticamente cualquier combinación de donantes. Esta falta de restricción de HLA también abre la posibilidad de usar donantes terceros (alogénicos) para la generación de las células supresoras. Al aplicar los conceptos y mecanismos presentemente descritos a la patogenia de la enfermedad humana, aislar células Treg para tratamiento y extensión en cultivo a largo plazo *ex vivo* de las células Treg de acuerdo con la presente invención, seguido de infundir las células Treg cultivadas resultantes en pacientes, ofrece un método para tratar respuestas autoinmunitarias o mejorar los resultados en trasplantes de médula ósea u otros. La disponibilidad de grandes cantidades de células Treg cultivadas permitirá una caracterización inmunológica, bioquímica y molecular más detallada de estas importantes células. No obstante, tal vez más notablemente, dado que los presentes métodos son adaptables para condiciones de GMP, los ensayos clínicos pueden ser pronto factibles, y las células Treg cultivadas pueden permitirse como una nueva forma de terapia inmunosupresora.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células T reguladoras (células Treg) CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ humanas terapéuticas, en donde dicho método comprende:
- 5 aislar una población de células T supresoras CD4⁺CD25⁺ humanas de una muestra de células T CD4⁺ usando purificación en columna que usa microesferas de CD25, en donde la purificación de doble columna comprende la purificación en una primera y en una segunda columna;
- 10 y expandir en cultivo las células Treg CD4⁺CD25⁺ *ex vivo* con microesferas recubiertas con anticuerpos hacia CD3 y CD28, y expandir en cultivo dicha población aislada de células Treg CD4⁺CD25⁺ humanas en presencia de IL-2, célula alimentadora CD4⁺ irradiada o el medio acondicionado de células alimentadoras CD4⁺ irradiadas, produciendo así células expandidas en cultivo, en donde dichas células Treg expandidas en cultivo son CD62L⁺/CD27⁺ y son capaces de inhibir la proliferación de células T respondedoras de CD4⁺CD25⁻ en un ensayo de Reacción Linfocitaria Mixta (MLR) por más de 90%.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en donde dicho método de purificación comprende poner en contacto la población aislada de células Treg CD4⁺CD25⁺ humanas con 2 µl de microesferas magnéticas anti-CD25 conjugadas por 10⁷ células totales, y purificar pasando la composición de células/esferas por una columna magnética para separar las células unidas a las esferas, lavar y re-eluir en una segunda columna magnética y nuevamente lavar hasta que permanezcan <1-2 % de las células inmunosupresoras en el aislamiento purificado.
- 20 3. El método según una de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la etapa de expandir en cultivo las células Treg CD4⁺CD25⁺ comprende activar la población aislada de células Treg CD4⁺CD25⁺ con microesferas recubiertas con anticuerpos hacia CD3 y CD28, y ampliar de este modo las células Treg expandidas en cultivo en un periodo de tiempo suficiente hasta que exista en el cultivo celular una cantidad eficaz de células Treg CD62L⁺/CD27⁺ para lograr la supresión terapéutica de una respuesta inmunitaria o autoinmunitaria en un ser humano.
- 25 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende enriquecer el medio para expandir las células en cultivo con IL-2.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende lograr una expansión de las células de por lo menos 10-20 veces dentro de 14 días de cultivo.
- 30 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende lograr una expansión de las células de por lo menos 100 veces, cultivando las células por 1-2 semanas adicionales.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas células Treg CD62L⁺/CD27⁺ mantienen la inhibición en el ensayo de MLR por más de 90% durante un periodo de más de 1 semana.
- 35 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en células hematopoyéticas o de sangre completa o parcialmente purificada, seleccionadas del grupo que consiste en células mononucleares de sangre periférica, linfocitos de sangre periférica, células del bazo, linfocitos infiltrantes de tumores, células de ganglios linfáticos, células de médula ósea y médula ósea de sangre periférica.
9. Una población de células Treg CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ activadas y fortalecidas por cultivo *ex vivo* producida por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde las células Treg inhiben la proliferación de células T respondedoras CD4⁺CD25⁻ en un ensayo de MLR por más de 90% y por más de 1 semana, y la cantidad de células expandidas es suficiente para la terapia eficaz en seres humanos.
- 40 10. Un método *in vitro* para inhibir la expansión de células T alorreactivas y la producción de citocinas, que comprende poner en contacto dicha células T alorreactivas con las células Treg CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ expandidas en cultivo *ex vivo* producidas por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 45 11. Las células Treg CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ expandidas en cultivo *ex vivo* producidas por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso como medicamento.
12. Un método *in vitro* para inhibir la actividad de los CTL, que comprende poner en contacto dicha células con las células Treg CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ expandidas en cultivo *ex vivo* producidas por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 50 13. El uso de células reguladoras T CD4⁺CD25⁺CD62L⁺CD27⁺ humanas producidas por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la preparación de un medicamento para suprimir, bloquear o inhibir la enfermedad injerto contra hospedante después del trasplante de tejido.

14. El uso de células reguladoras T $CD4^+CD25^+CD62L^+CD27^+$ humanas producidas por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en la supresión, el bloqueo o la inhibición de la enfermedad injerto contra hospedante después del trasplante de tejido.
- 5 15. Uso de células reguladoras T $CD4^+CD25^+CD62L^+CD27^+$ humanas producidas por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la preparación de un medicamento para la prevención de una alorrespuesta o respuesta autoinmunitaria, en donde dicho medicamento es para la administración antes del inicio de una alorrespuesta o una respuesta autoinmunitaria.
- 10 16. El uso según la reivindicación 15, en donde el medicamento es para la prevención o el tratamiento de la enfermedad injerto contra hospedante de pacientes de trasplante, en donde dicho medicamento es para la administración antes, durante o inmediatamente después del trasplante de tejido.
17. El uso según la reivindicación 16, en donde dicho medicamento es para bloquear el rechazo del tejido trasplantado.
- 15 18. Células reguladoras T $CD4^+CD25^+CD62L^+CD27^+$ humanas producidas por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en la prevención de una alorrespuesta o respuesta autoinmunitaria en un paciente, por administración de las células antes del inicio de una alorrespuesta o respuesta autoinmunitaria.
19. Células reguladoras T $CD4^+CD25^+CD62L^+CD27^+$ humanas para uso según la reivindicación 18, para la prevención o el tratamiento de la enfermedad injerto contra hospedante de pacientes de trasplante, por administración de las células antes, durante o inmediatamente después del trasplante de tejido.
- 20 20. Células reguladoras T $CD4^+CD25^+CD62L^+CD27^+$ humanas para uso según la reivindicación 19, para bloquear el rechazo de los tejidos trasplantados.

FIG. 1

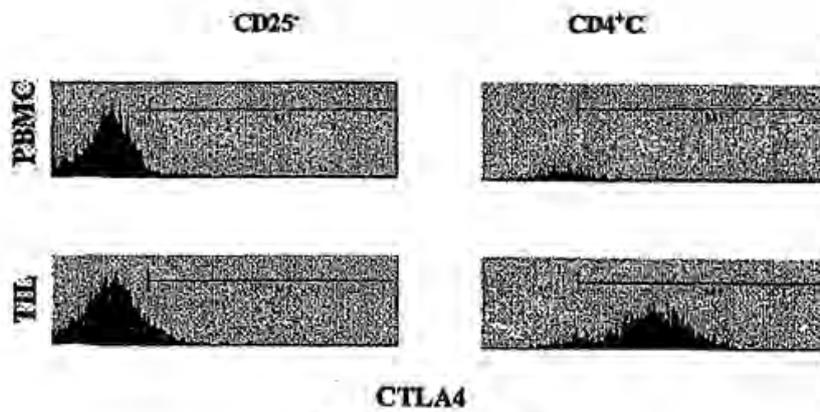
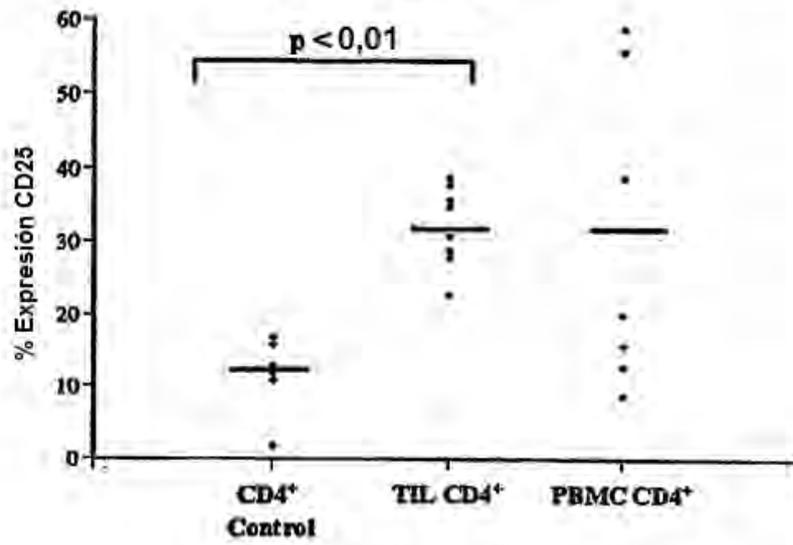


FIG. 2A

FIG. 2B

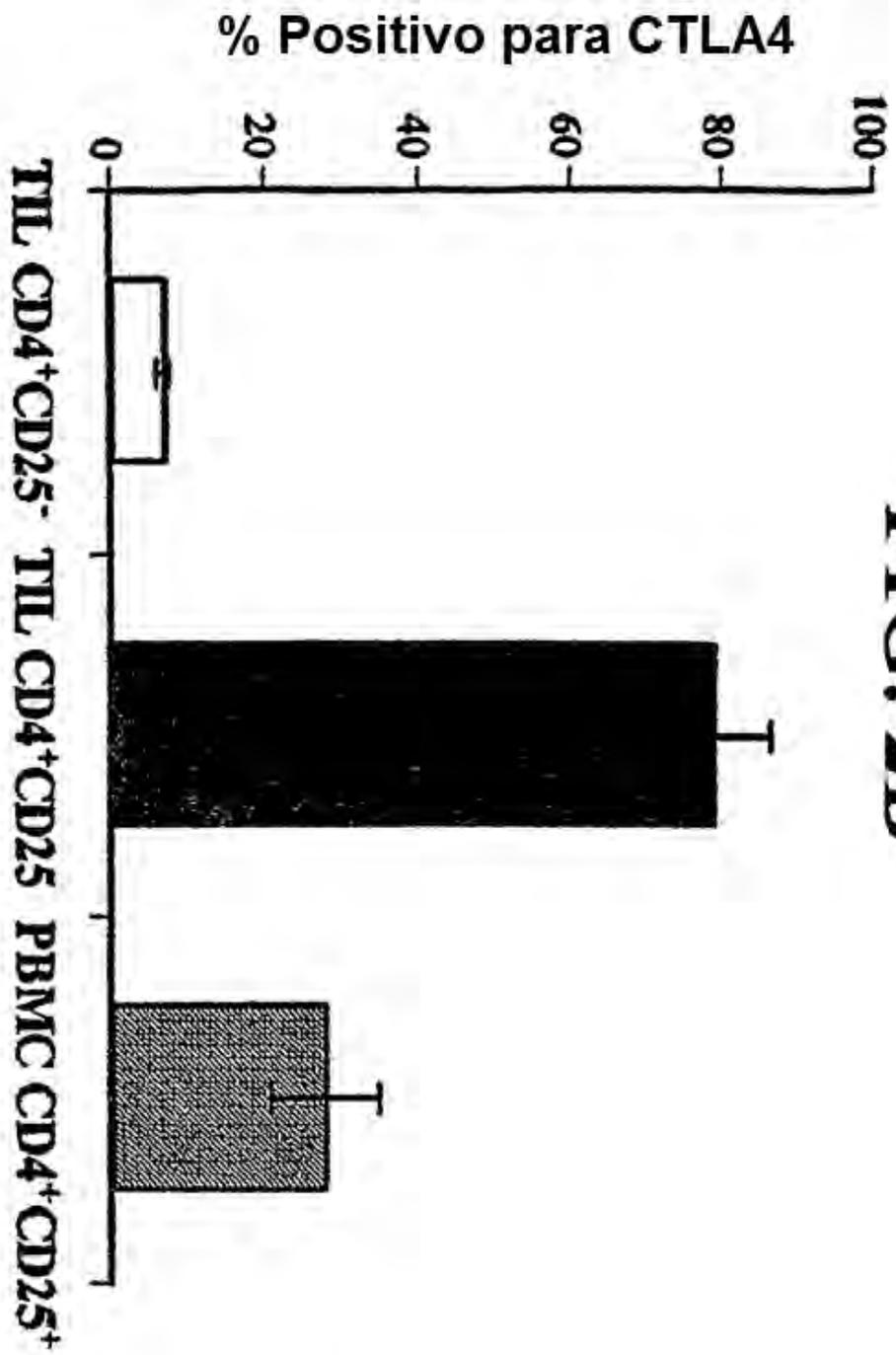
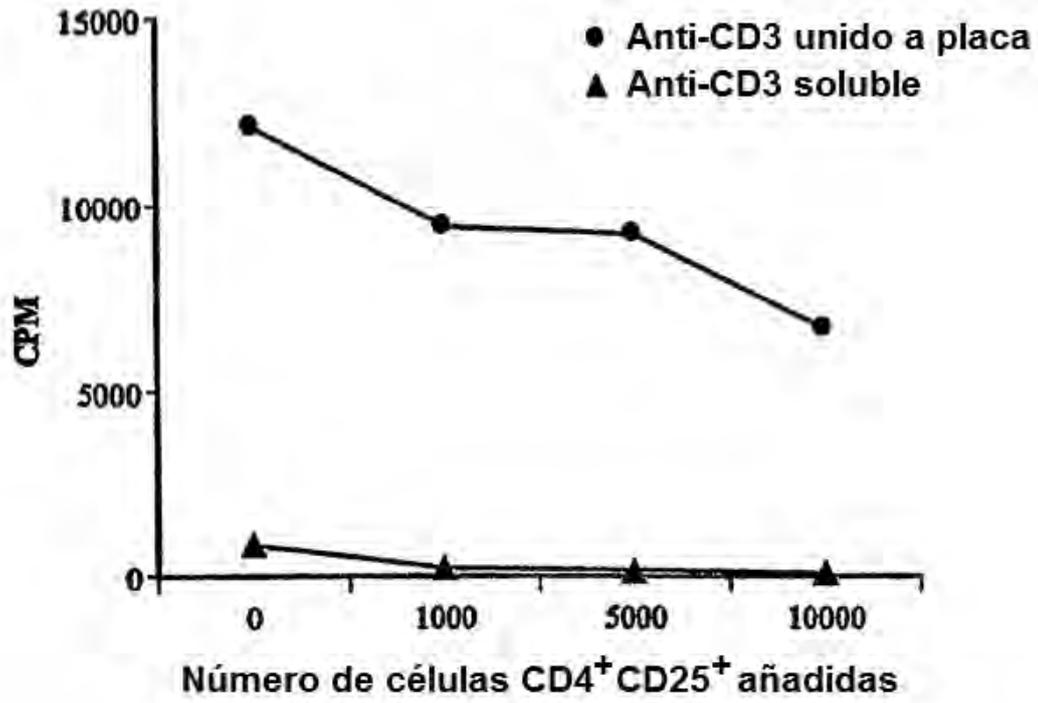


FIG. 3A



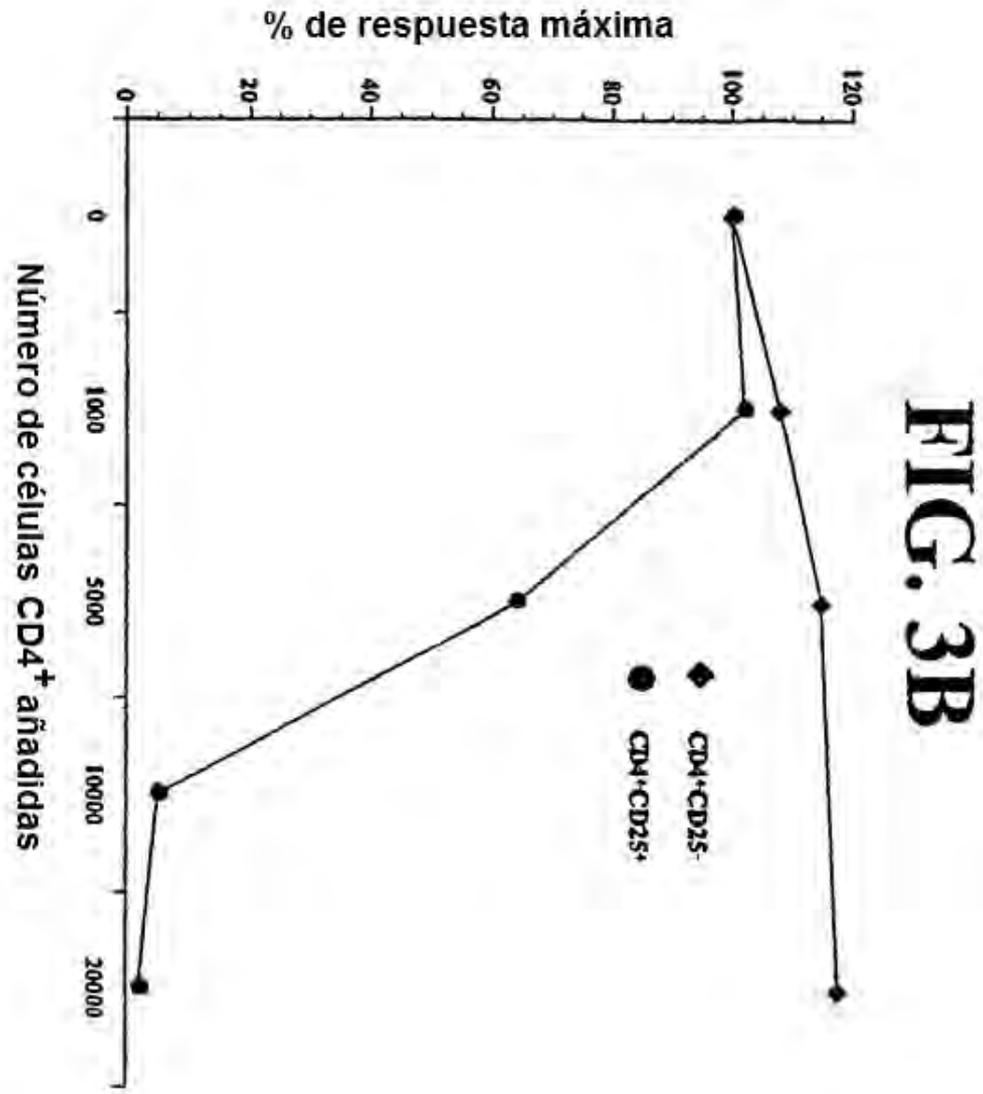


FIG. 4A

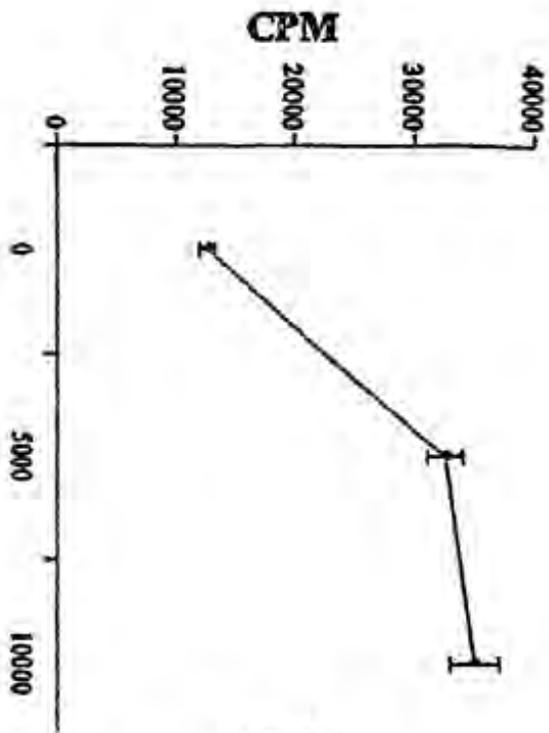
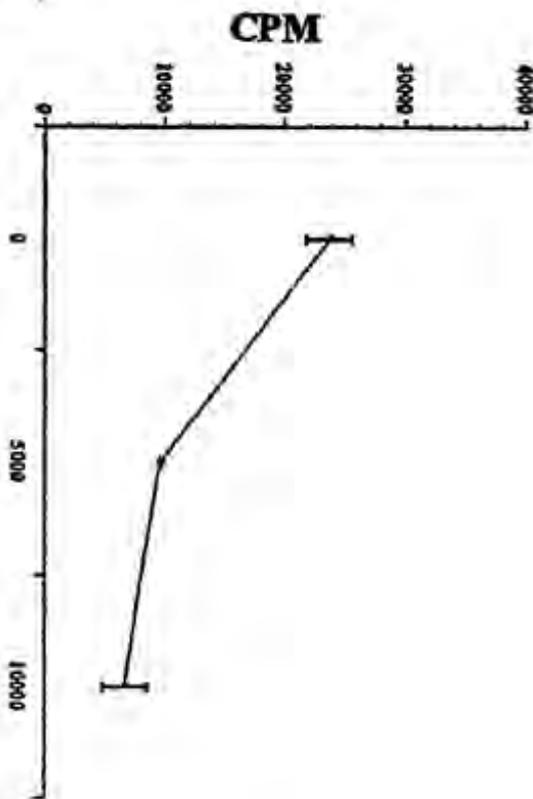


FIG. 4B



Número de células CD4⁺ CD25⁺ añadidas

FIG. 4C

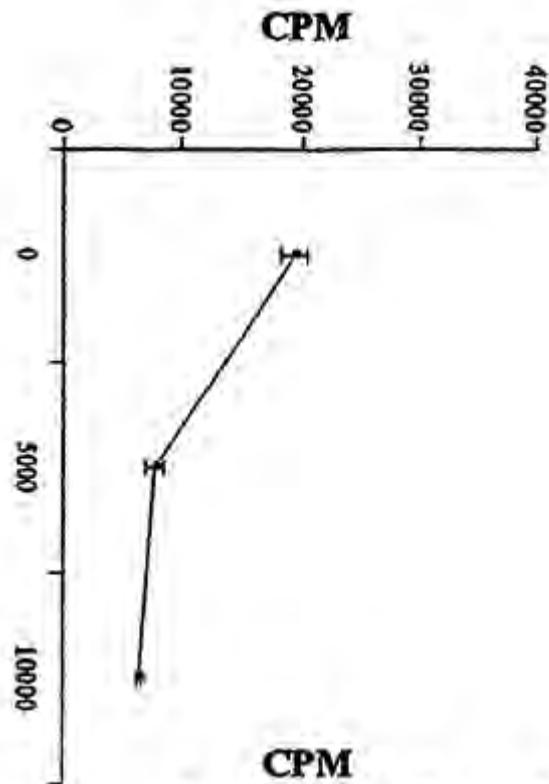
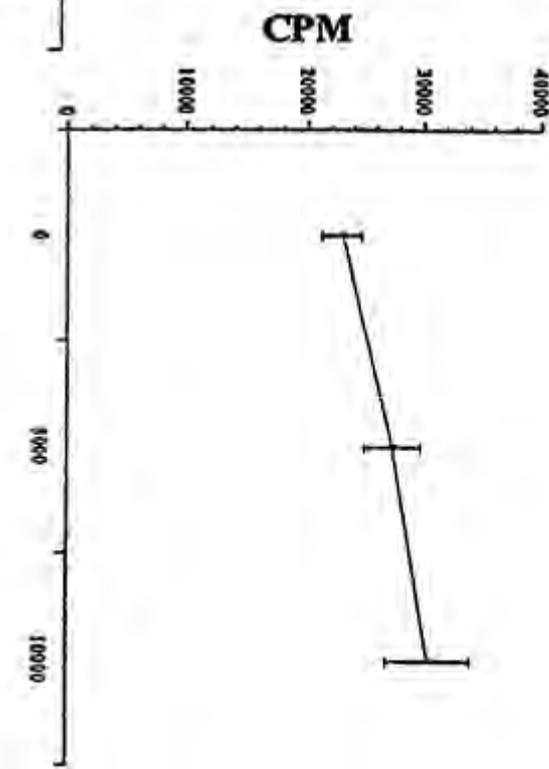


FIG. 4D



Número de células CD4⁺CD25⁺ añadidas

FIG. 5A

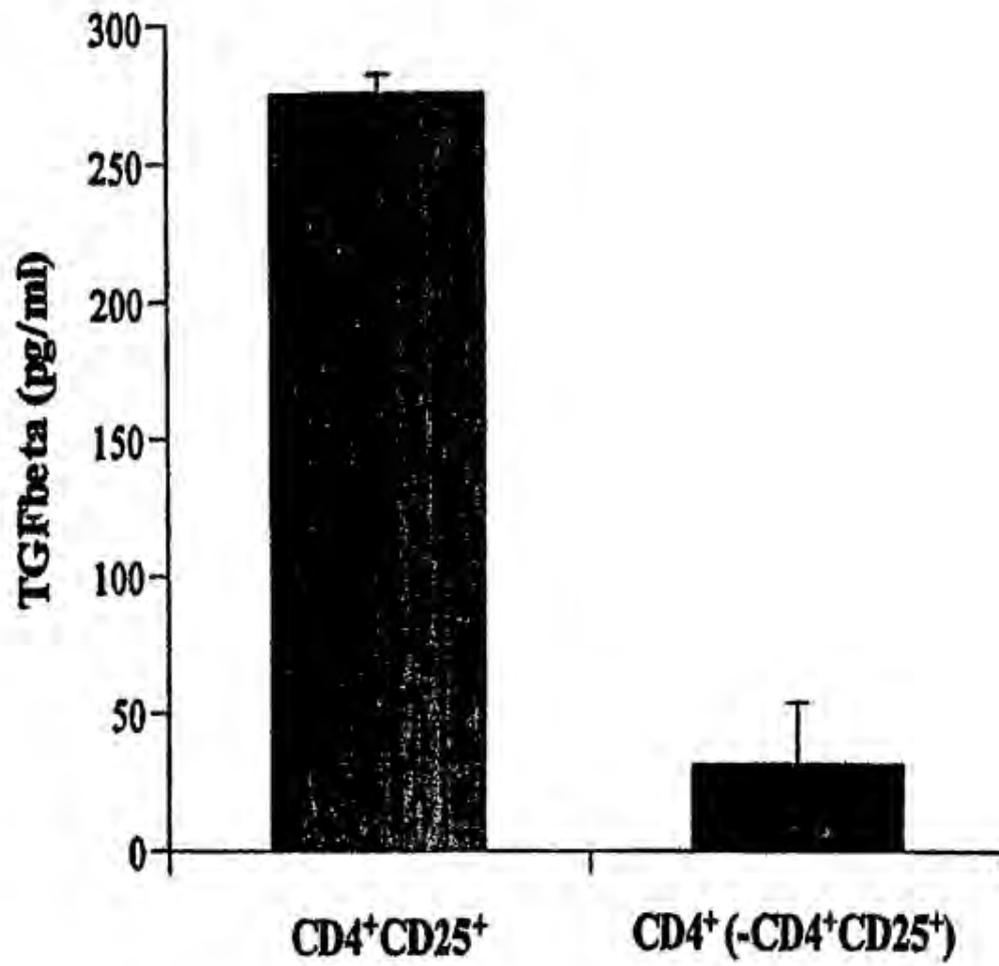


FIG. 5B

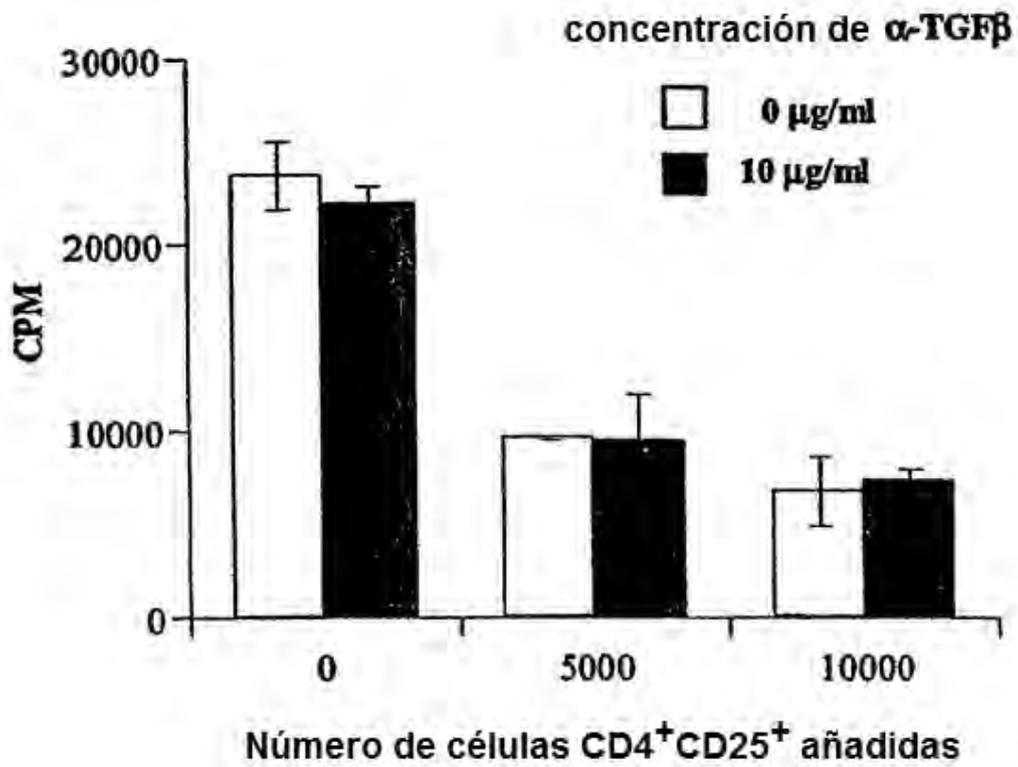


FIG 6A

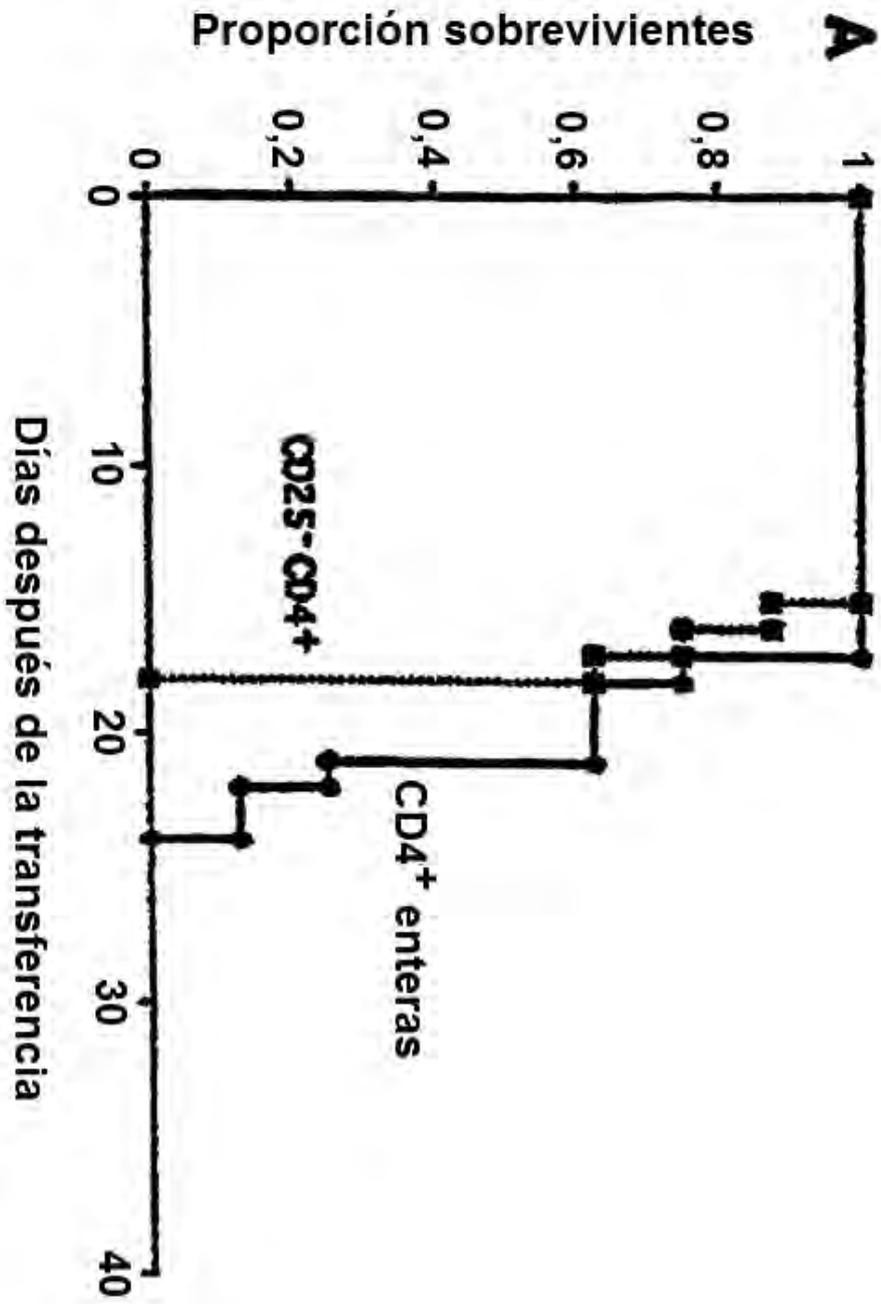


FIG. 6B

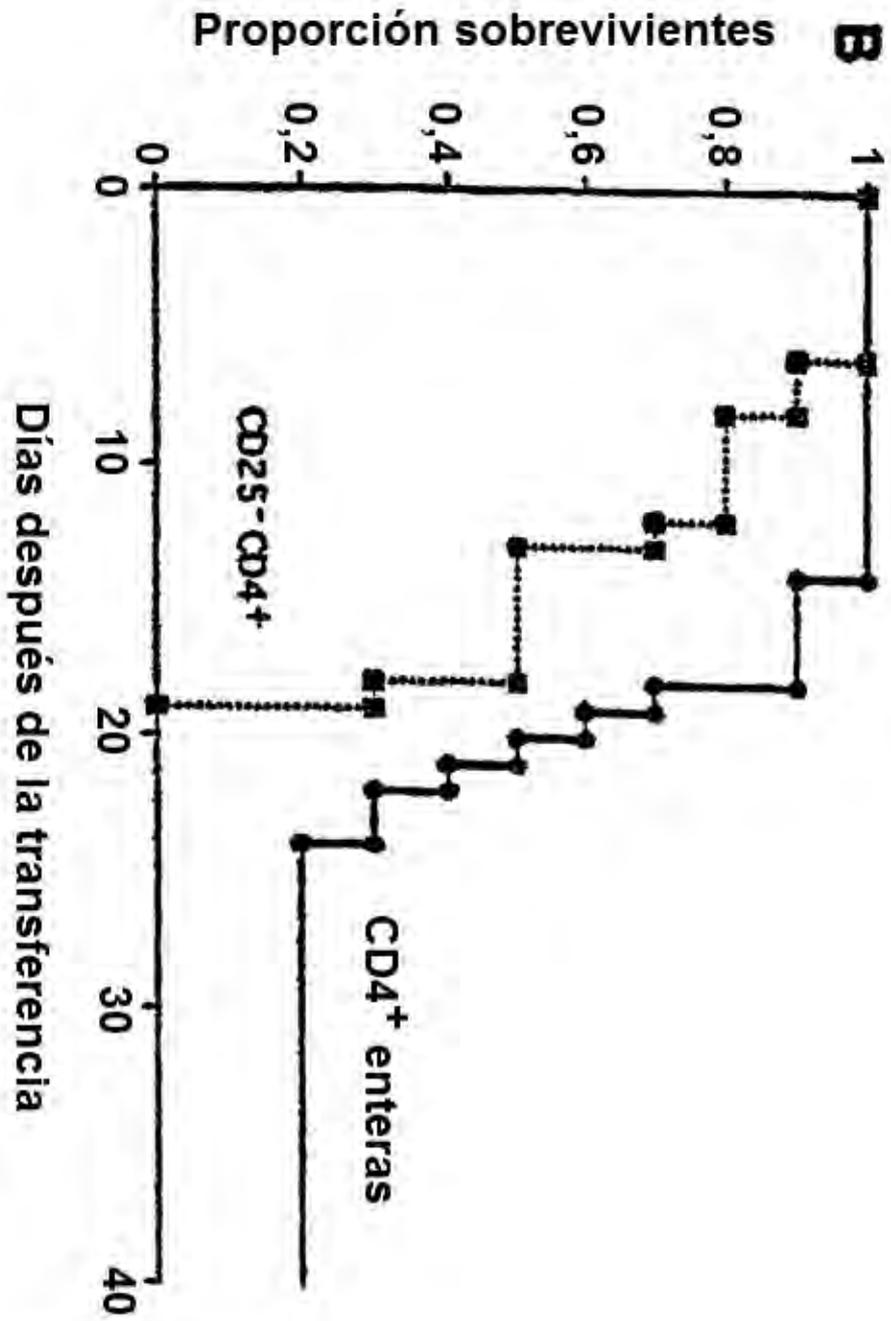


FIG. 7

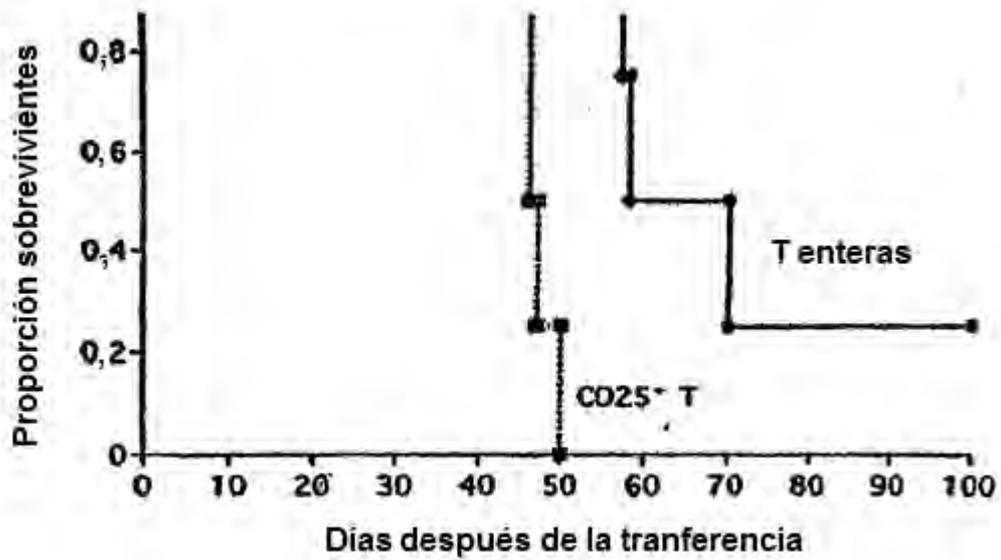
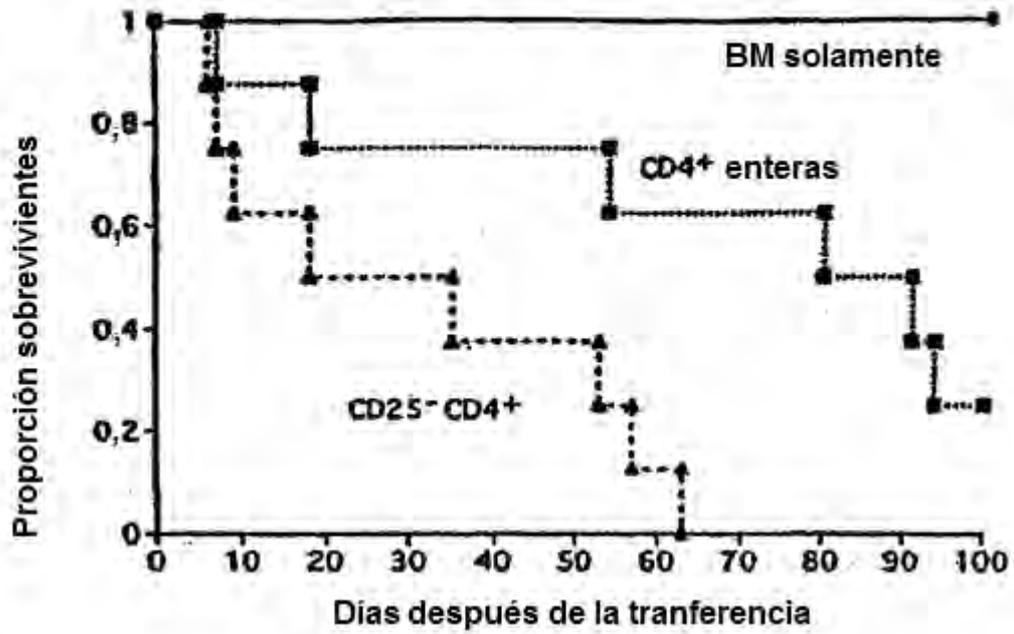
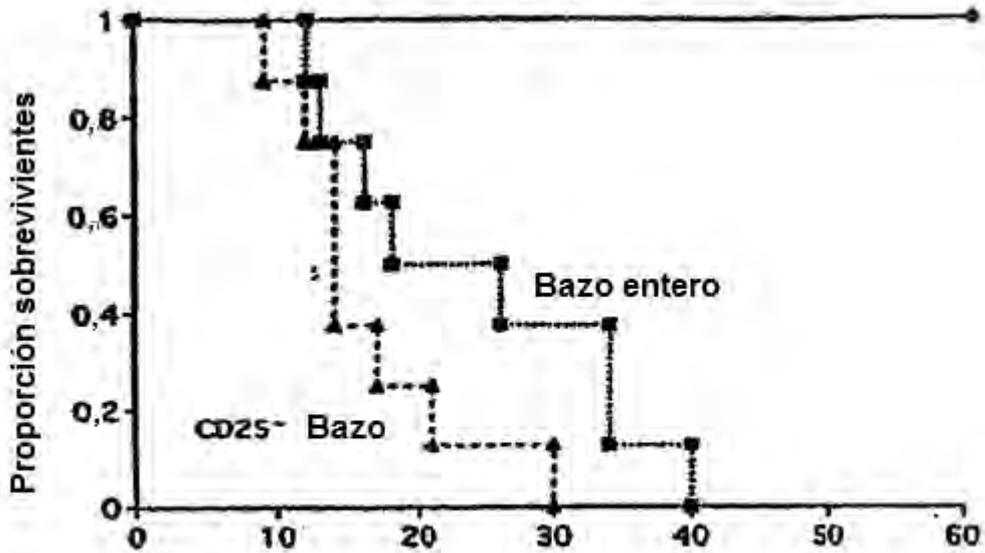


FIG. 8

FIG. 9



3498 TAYLOR et al

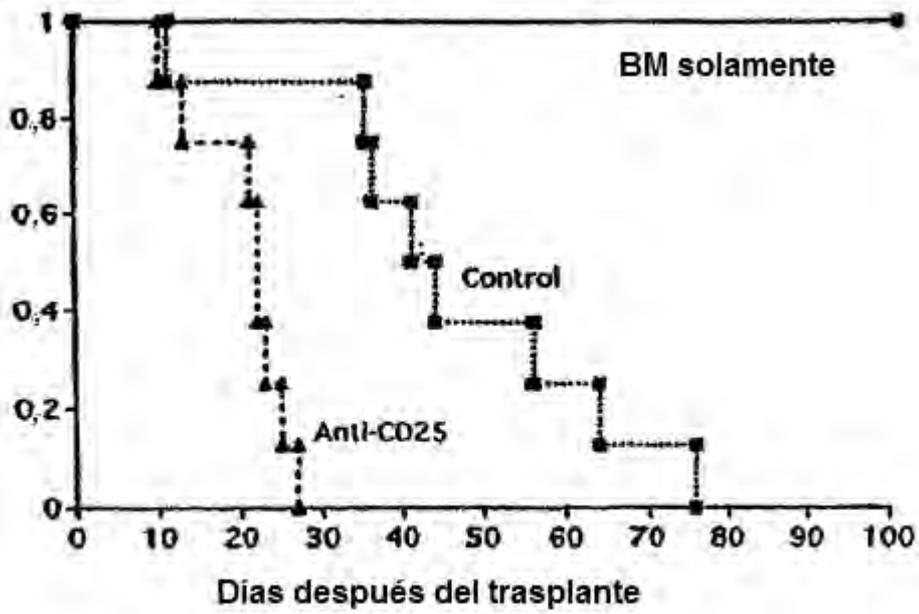


FIG. 10

FIG. 11

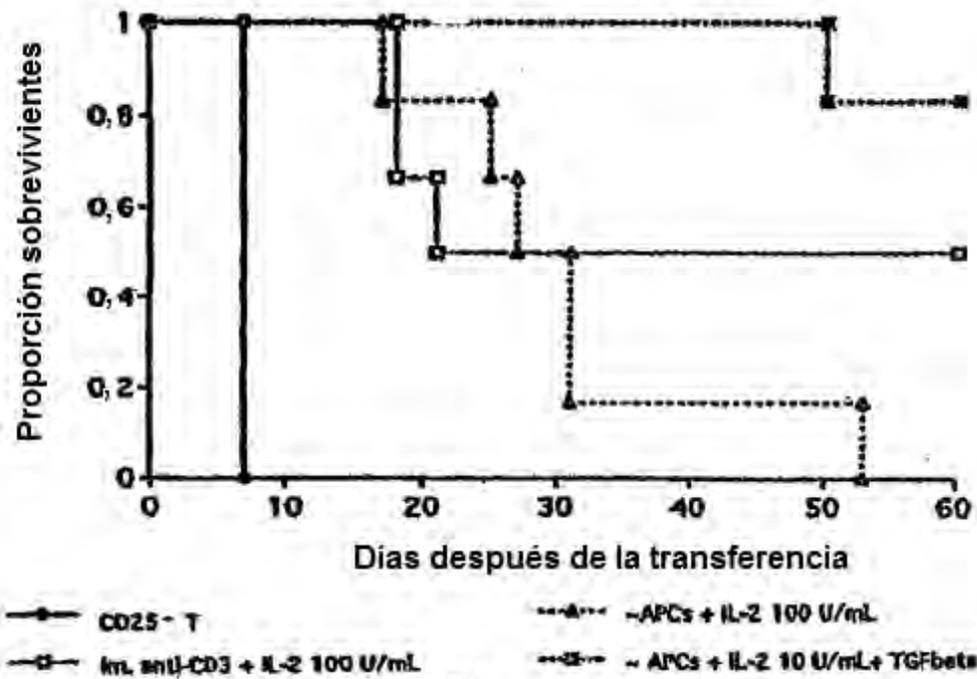
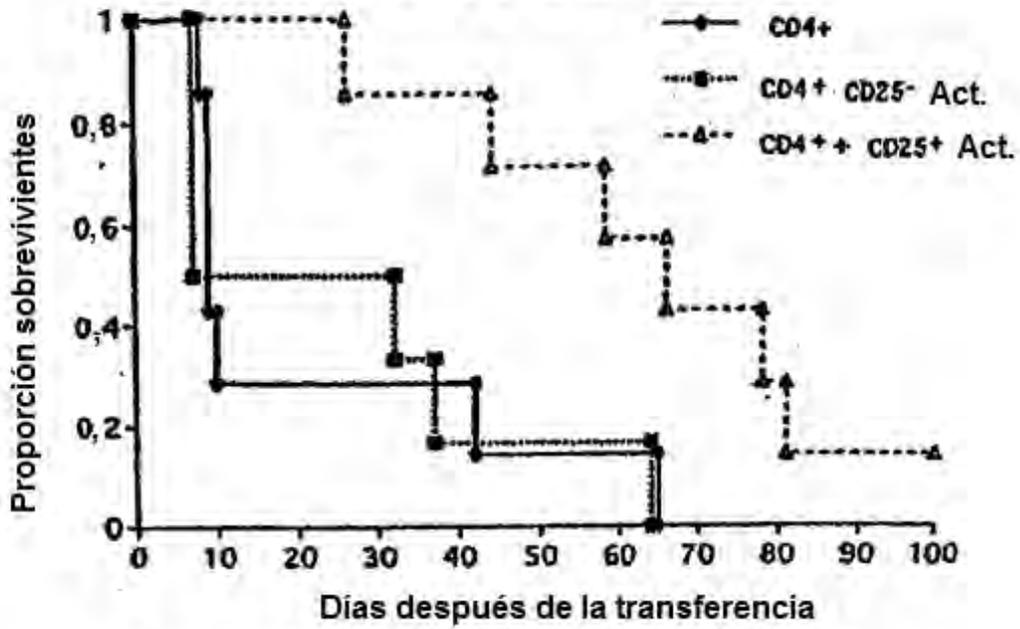


FIG. 12

FIG. 13

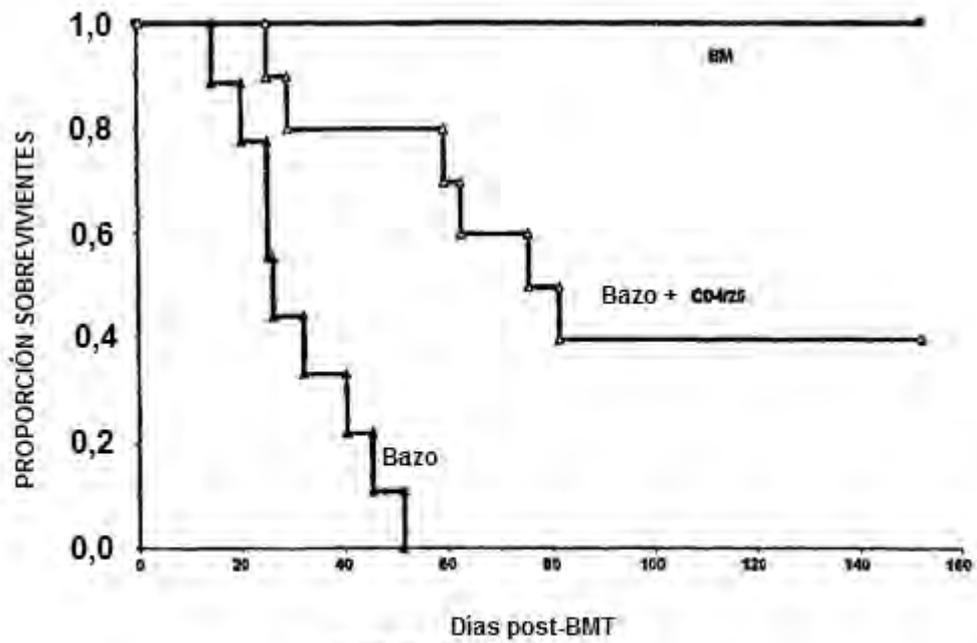
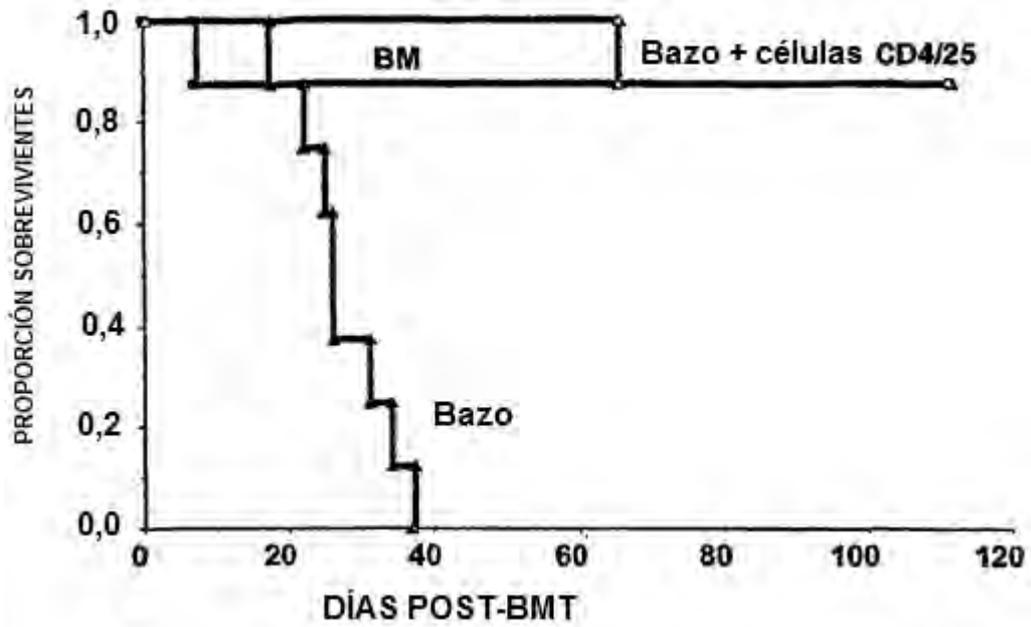


FIG. 14

FIG. 15A

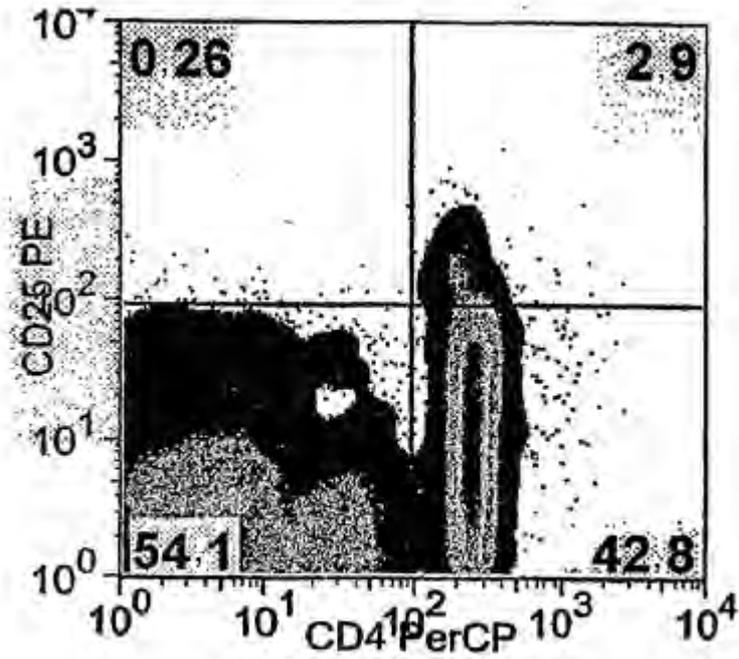
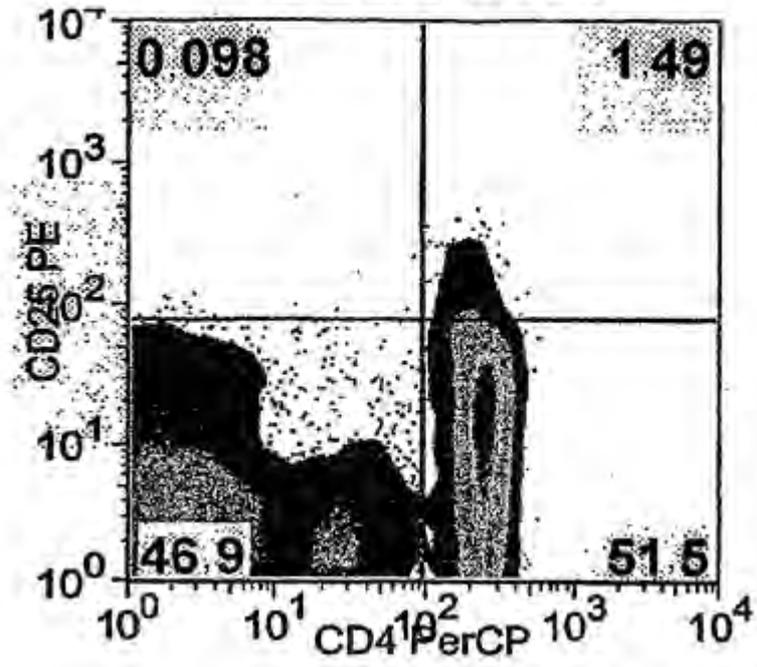


FIG. 15B

FIG. 15C

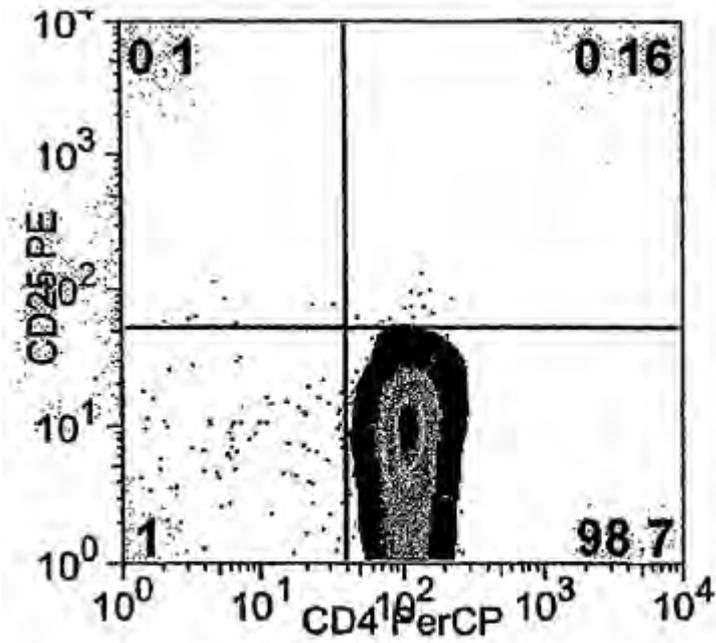
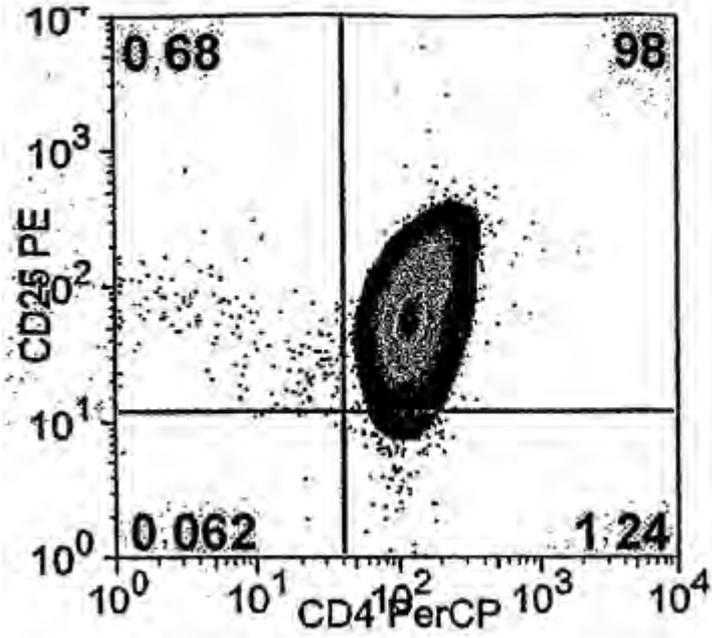


FIG. 15D

FIG. 16A

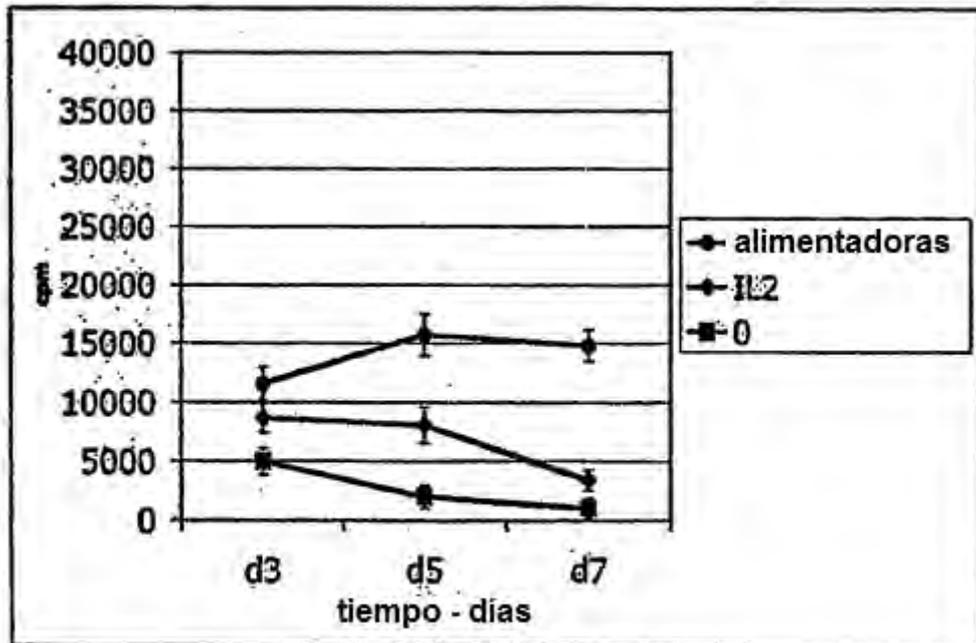
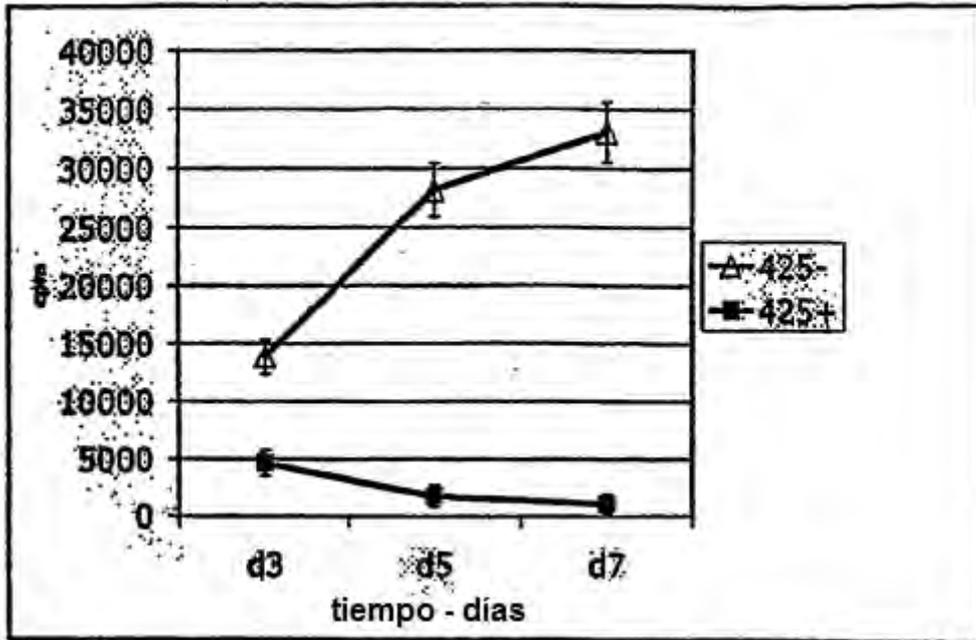


FIG. 16B

FIG. 16C

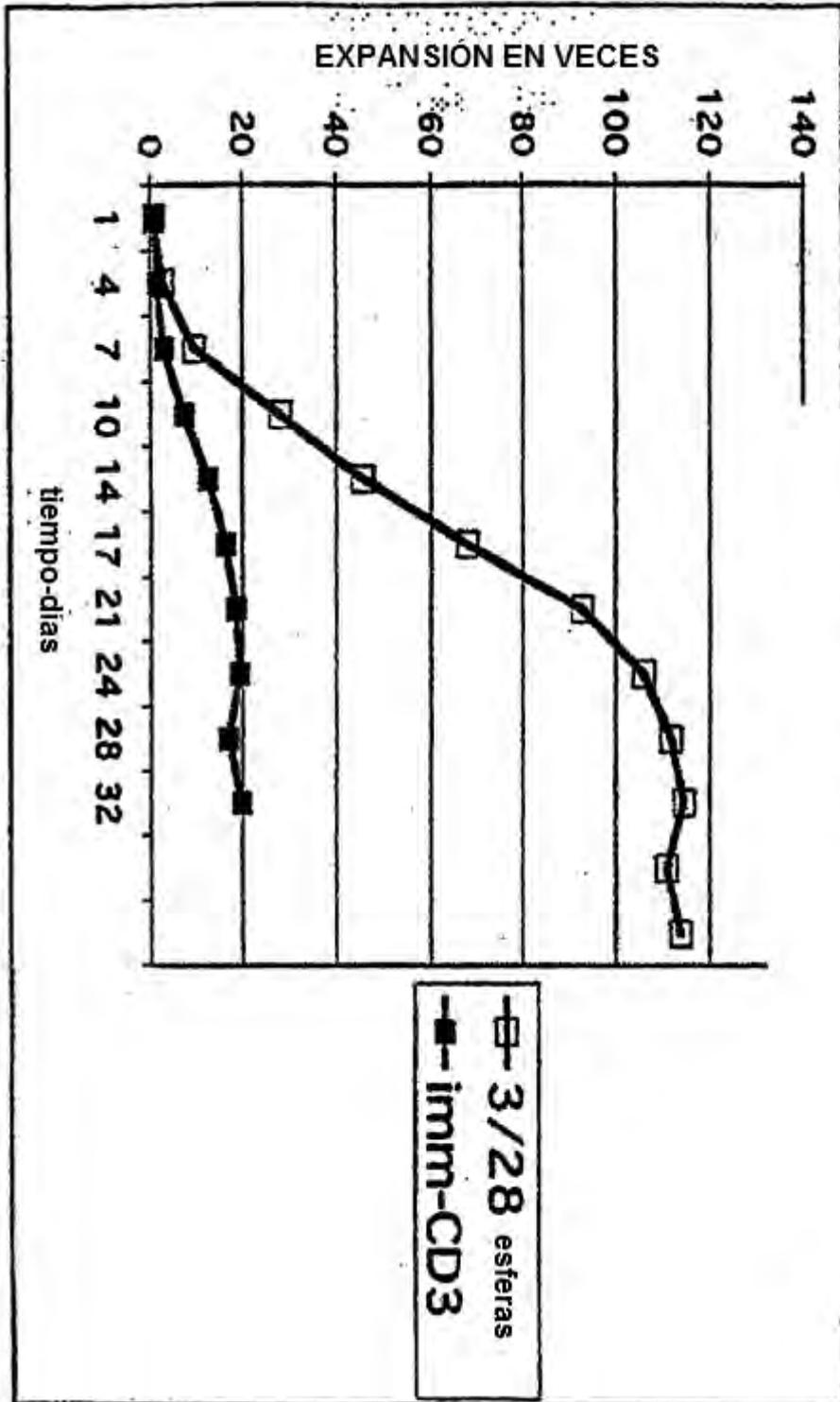


FIG. 17A

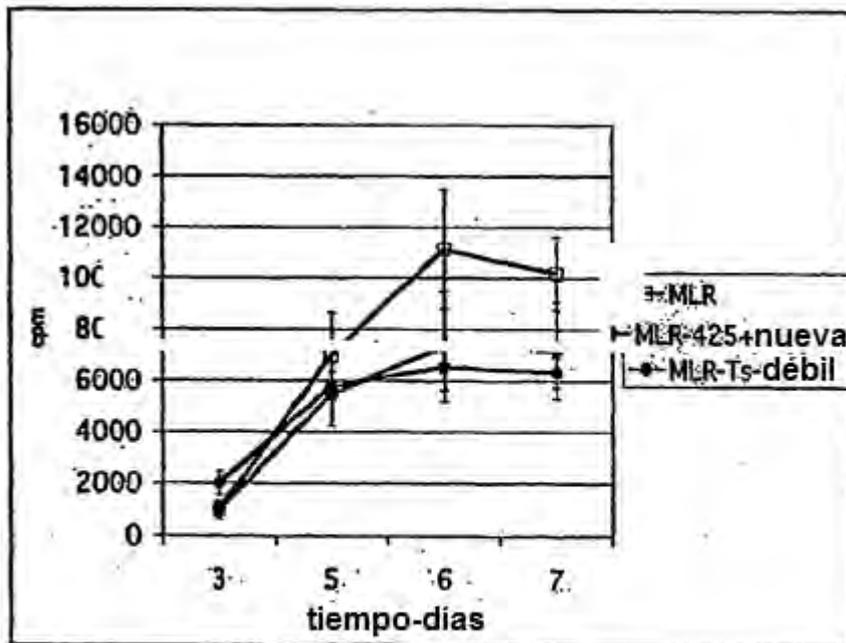
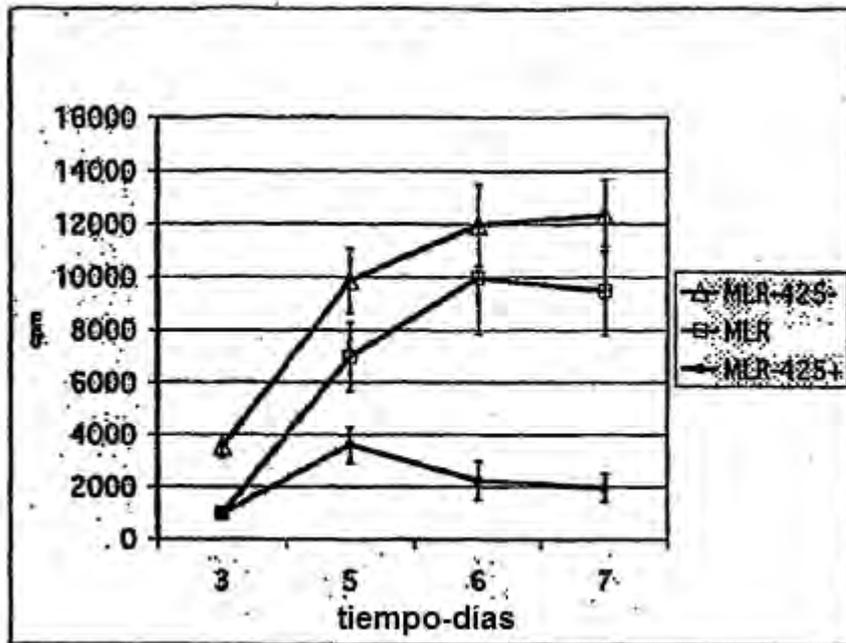


FIG. 17B

FIG. 17C

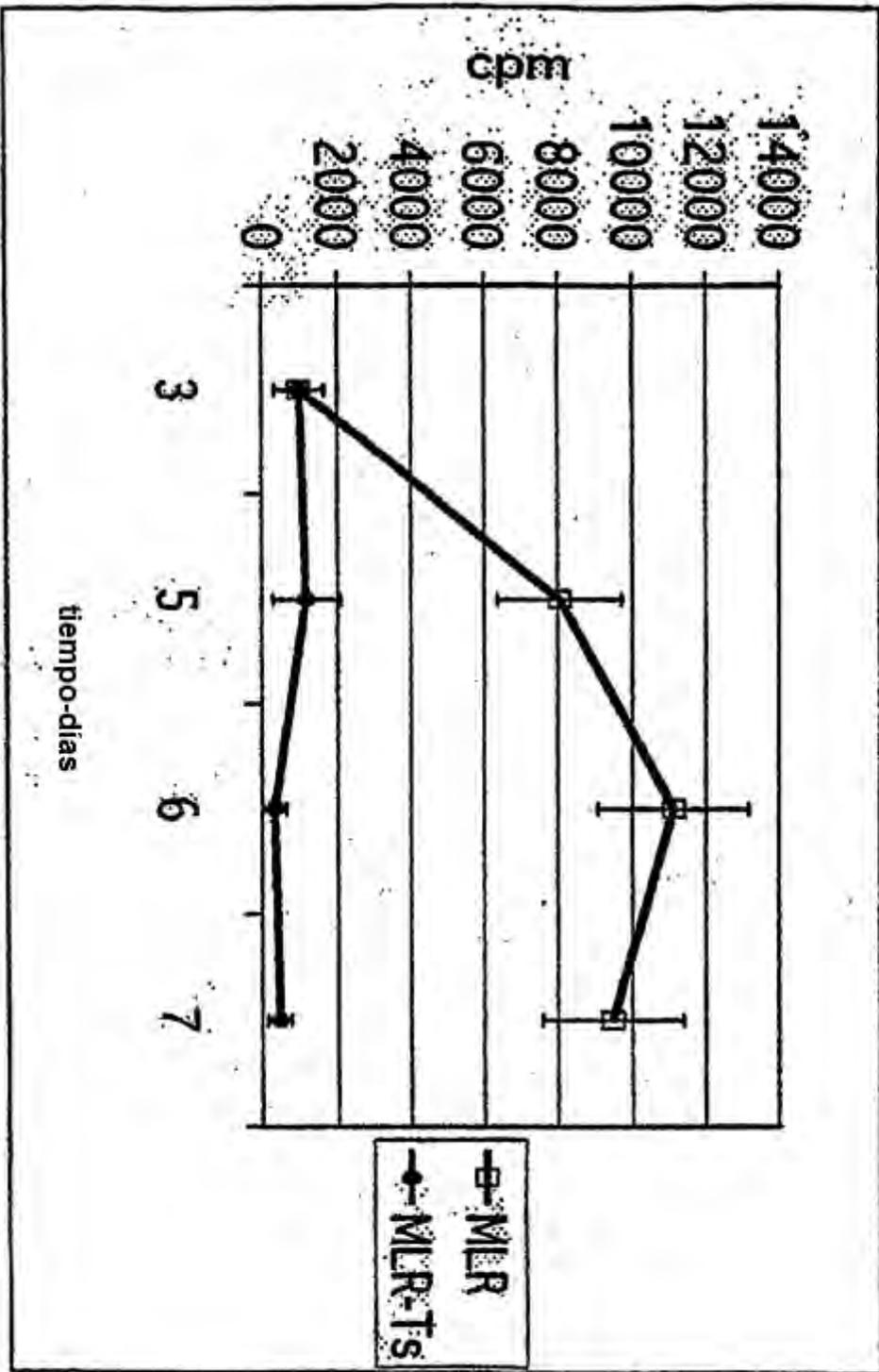


FIG. 18A

CD4+CD25(-)

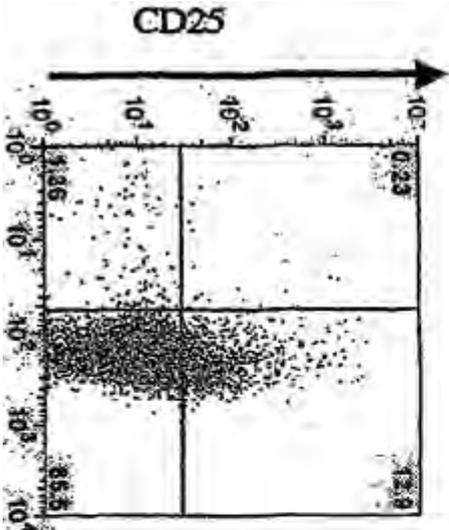


FIG. 18B

T_s

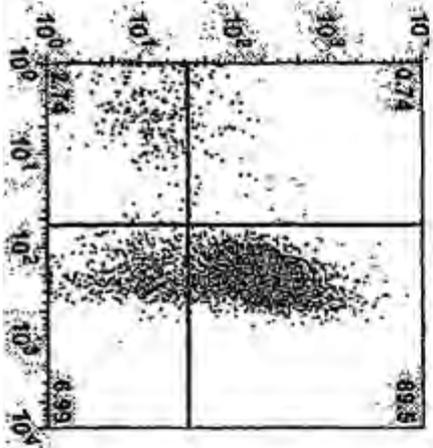


FIG. 18C

T_s - débiles

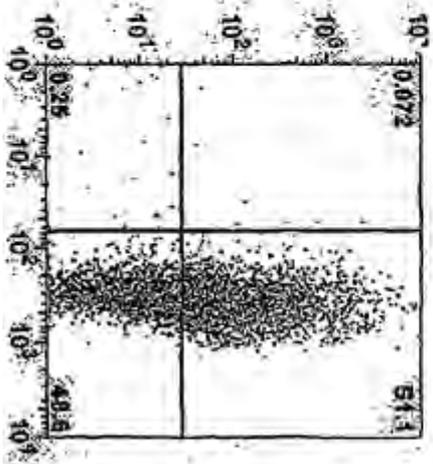


FIG. 18D

FIG. 18E

FIG. 18F

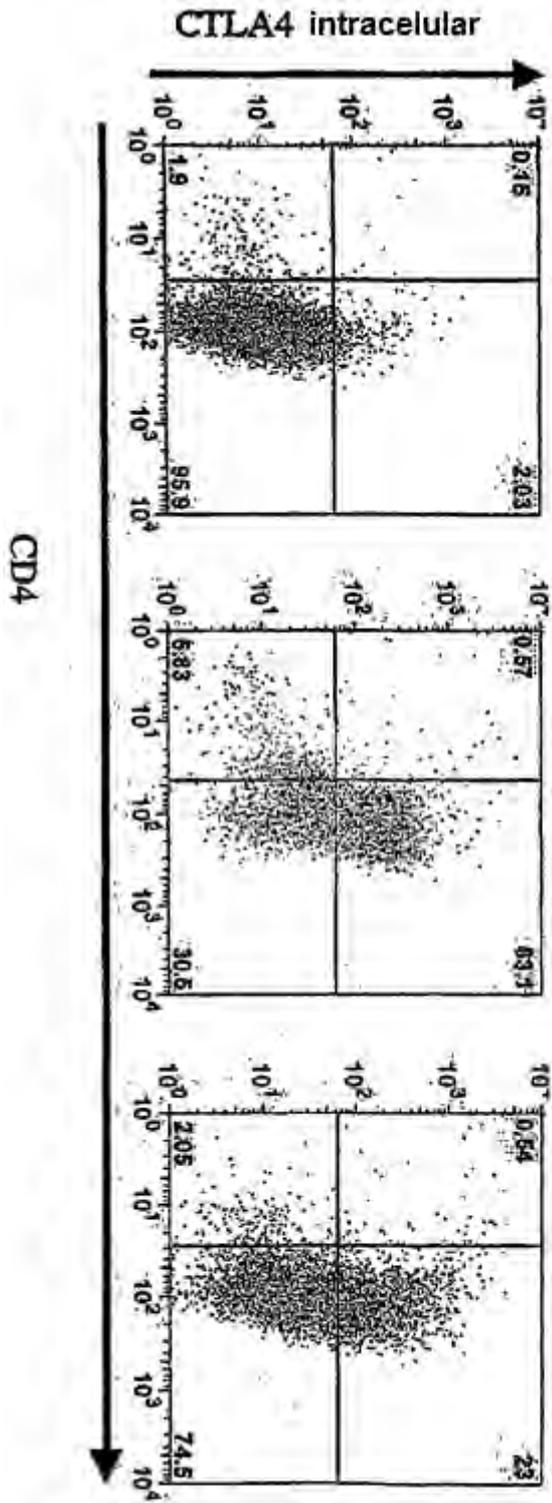


FIG. 18G

FIG. 18H

FIG. 18I

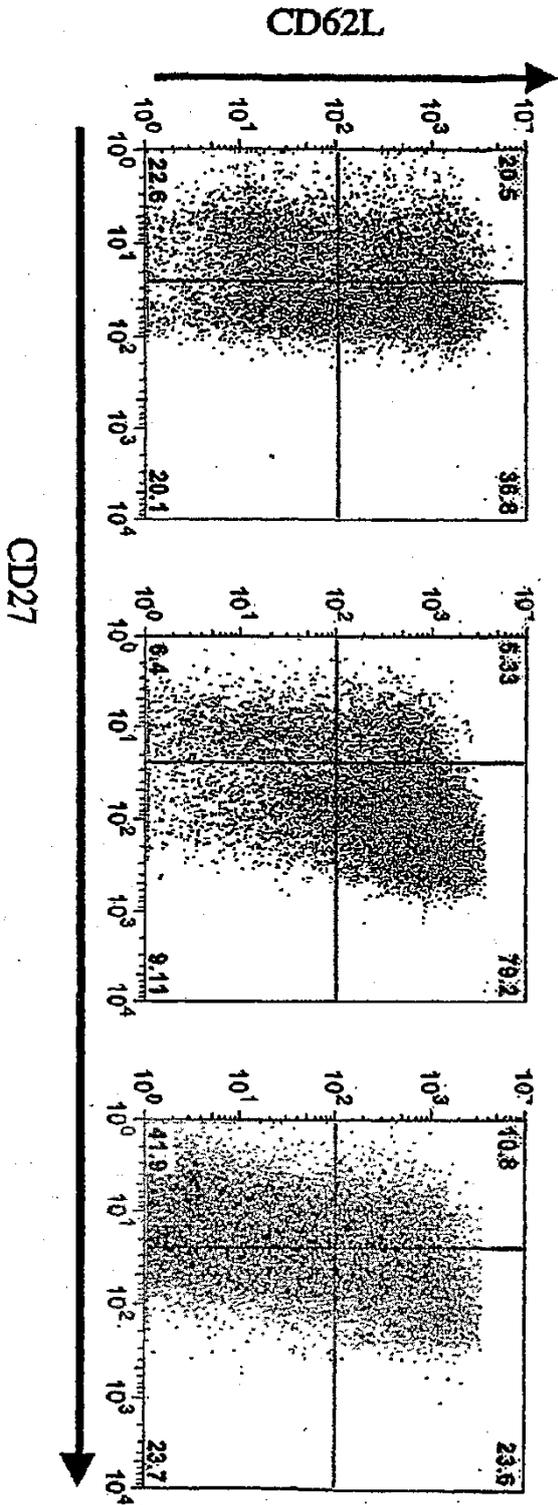
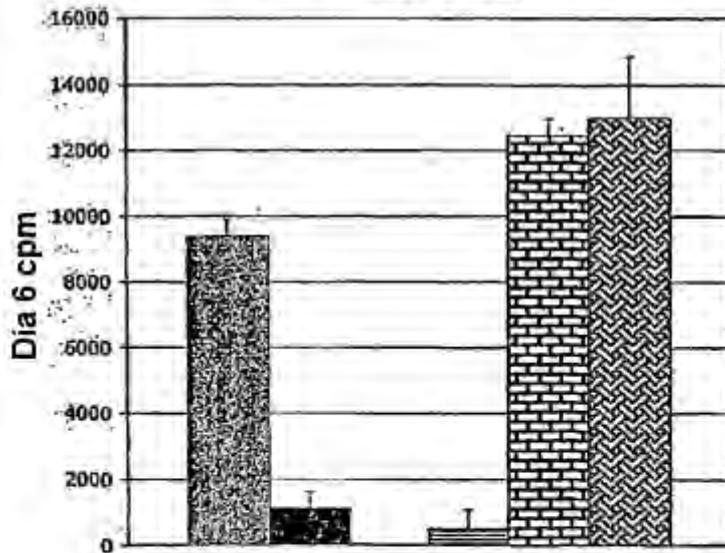
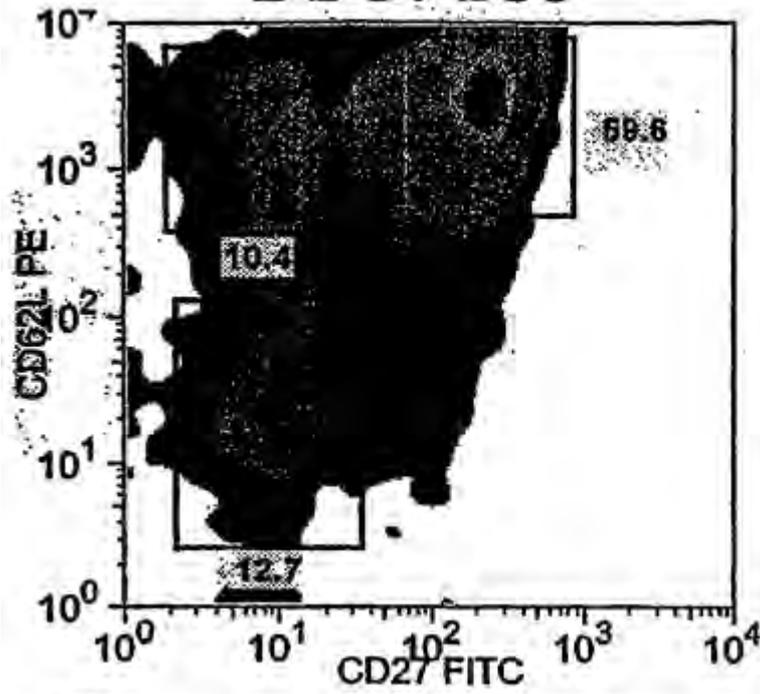


FIG. 18J



MLR MLR-Ts CD62L+ CD62L+ CD62L-
CD27+ CD27- CD27-

FIG. 18K

FIG. 19A

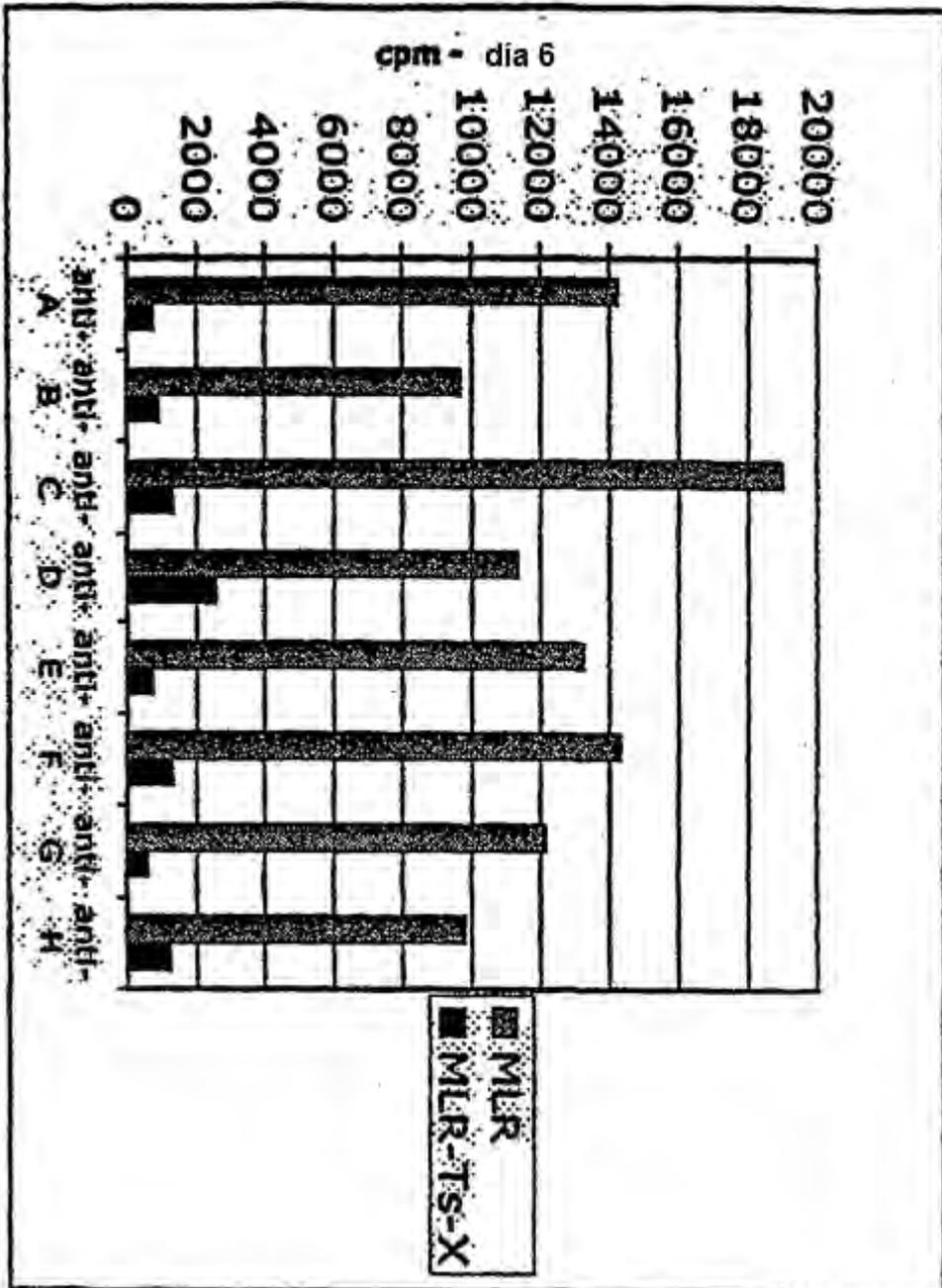


FIG. 19B

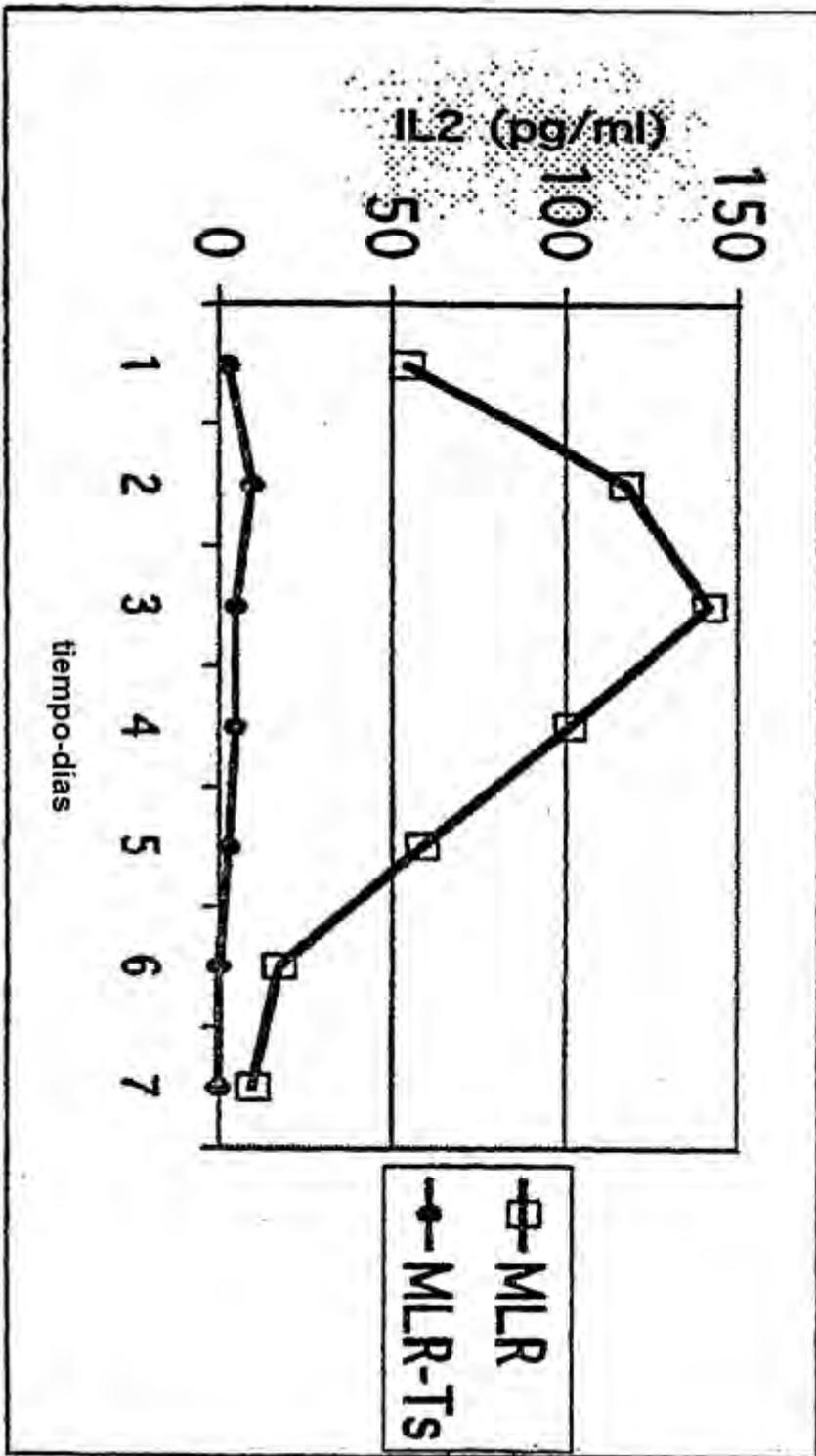


FIG. 19C

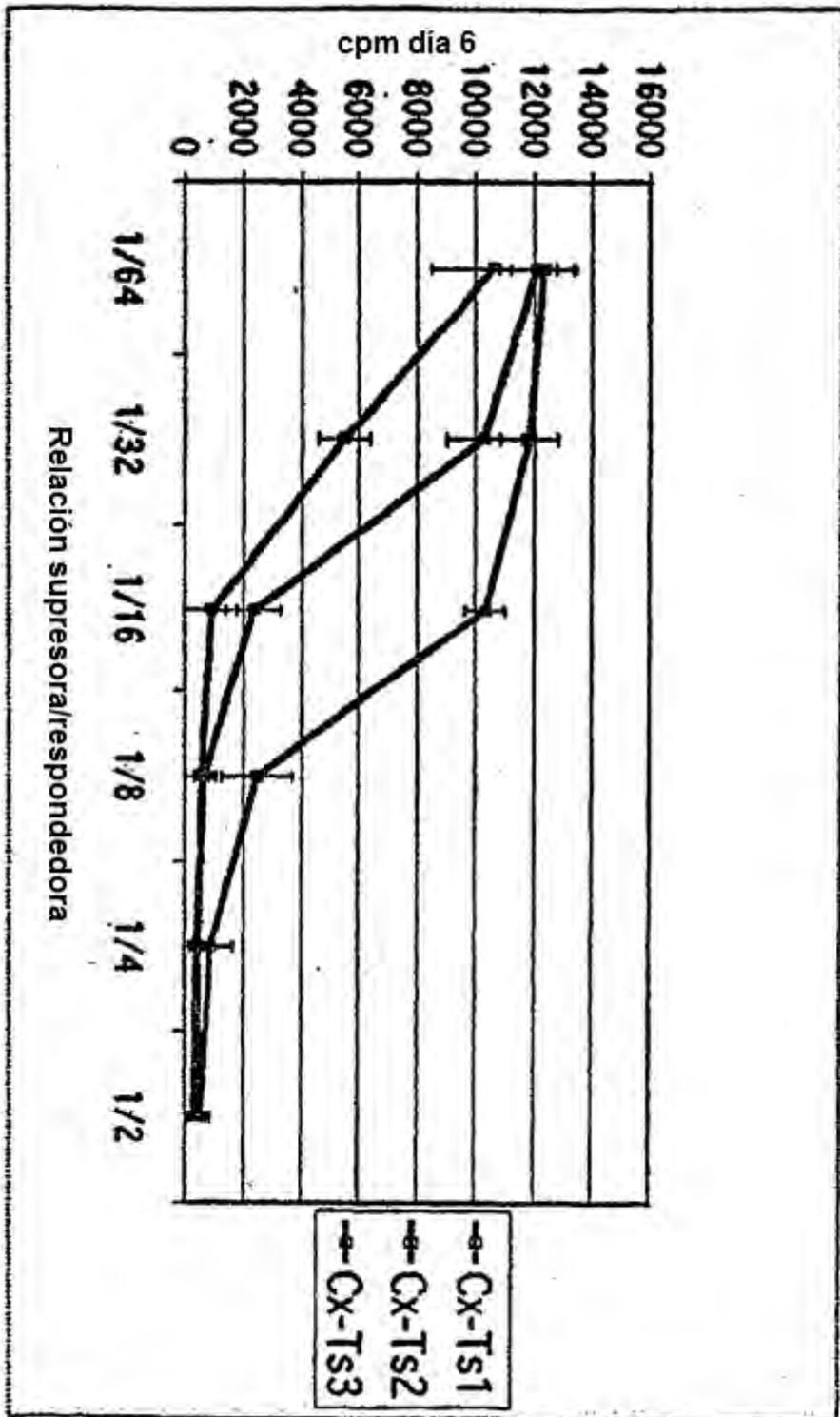


FIG. 19D

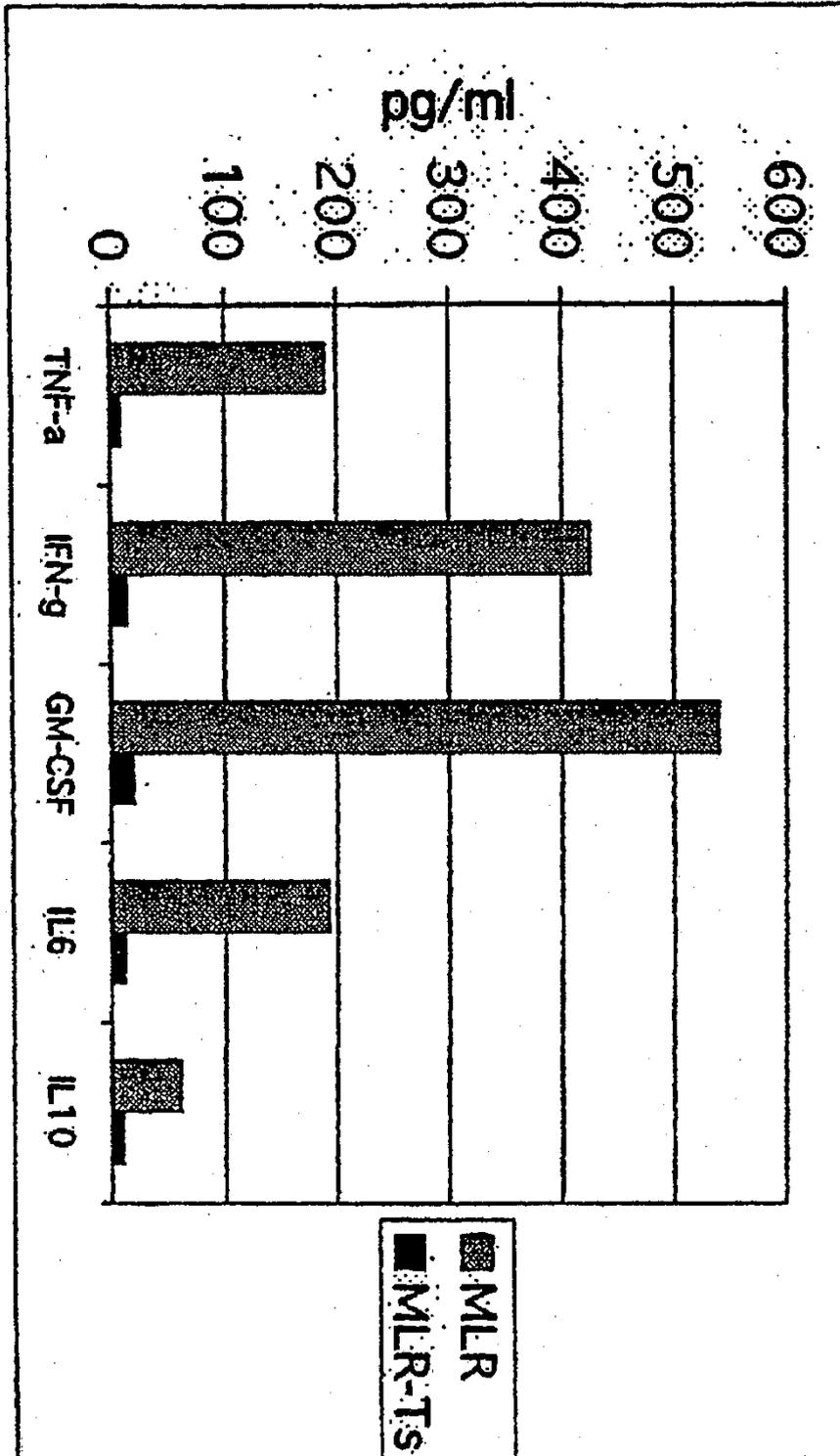


FIG. 20A

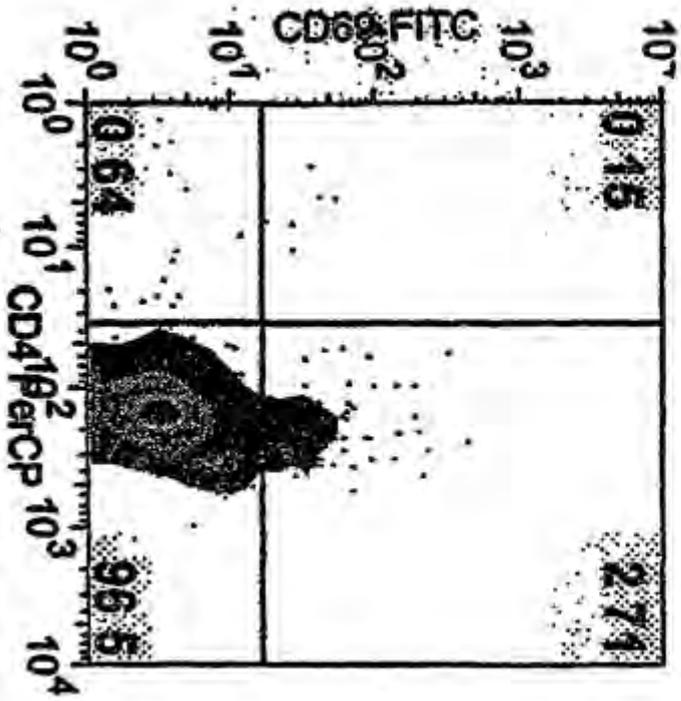


FIG. 20B

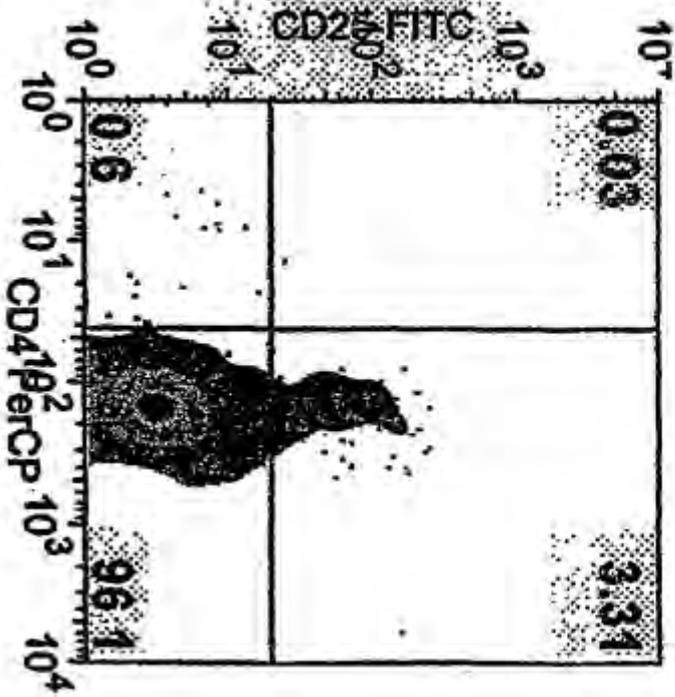


FIG. 20C

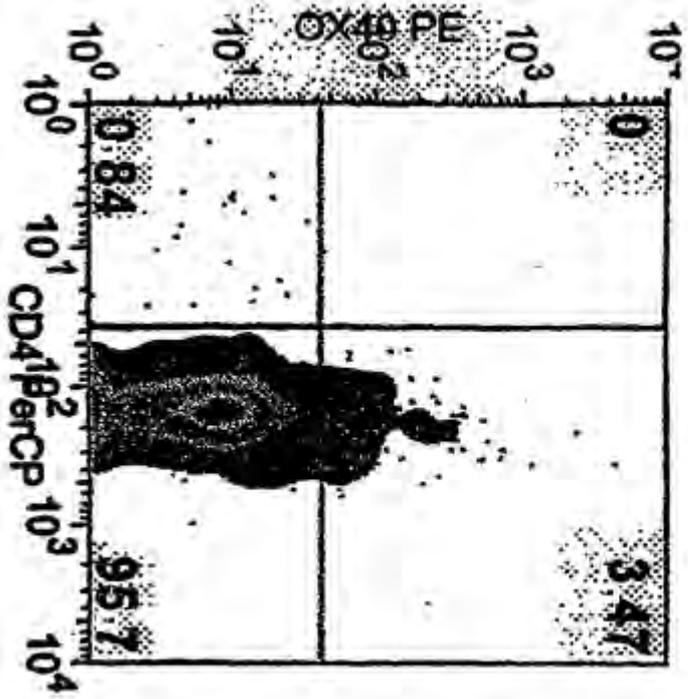


FIG. 20D

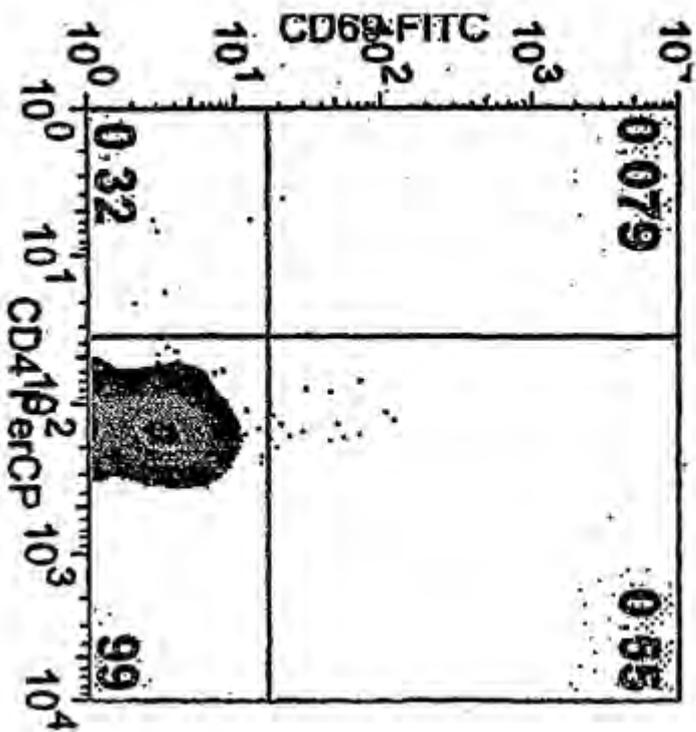


FIG. 20E

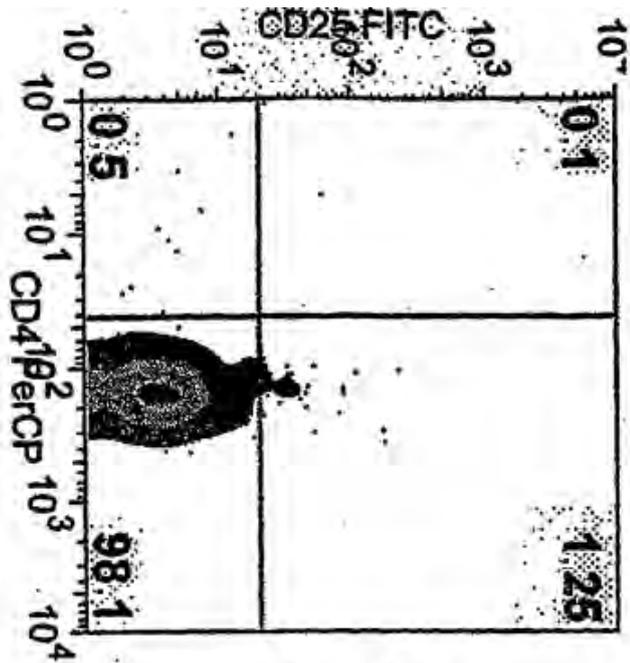


FIG. 20F

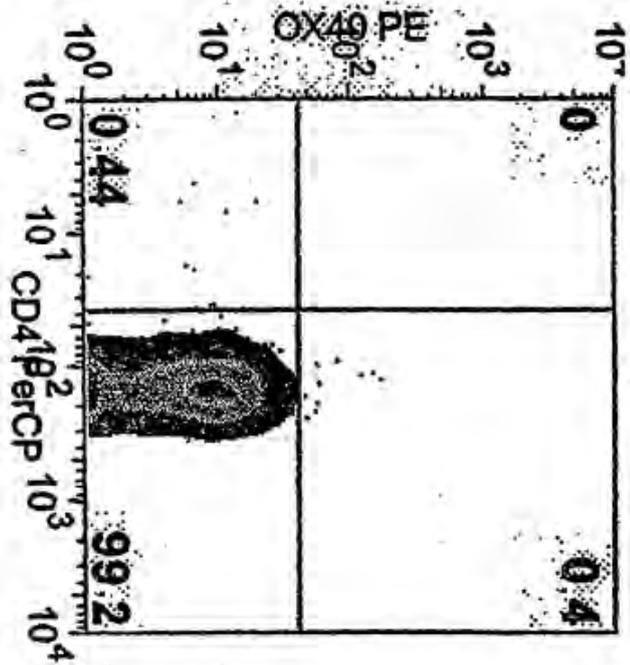
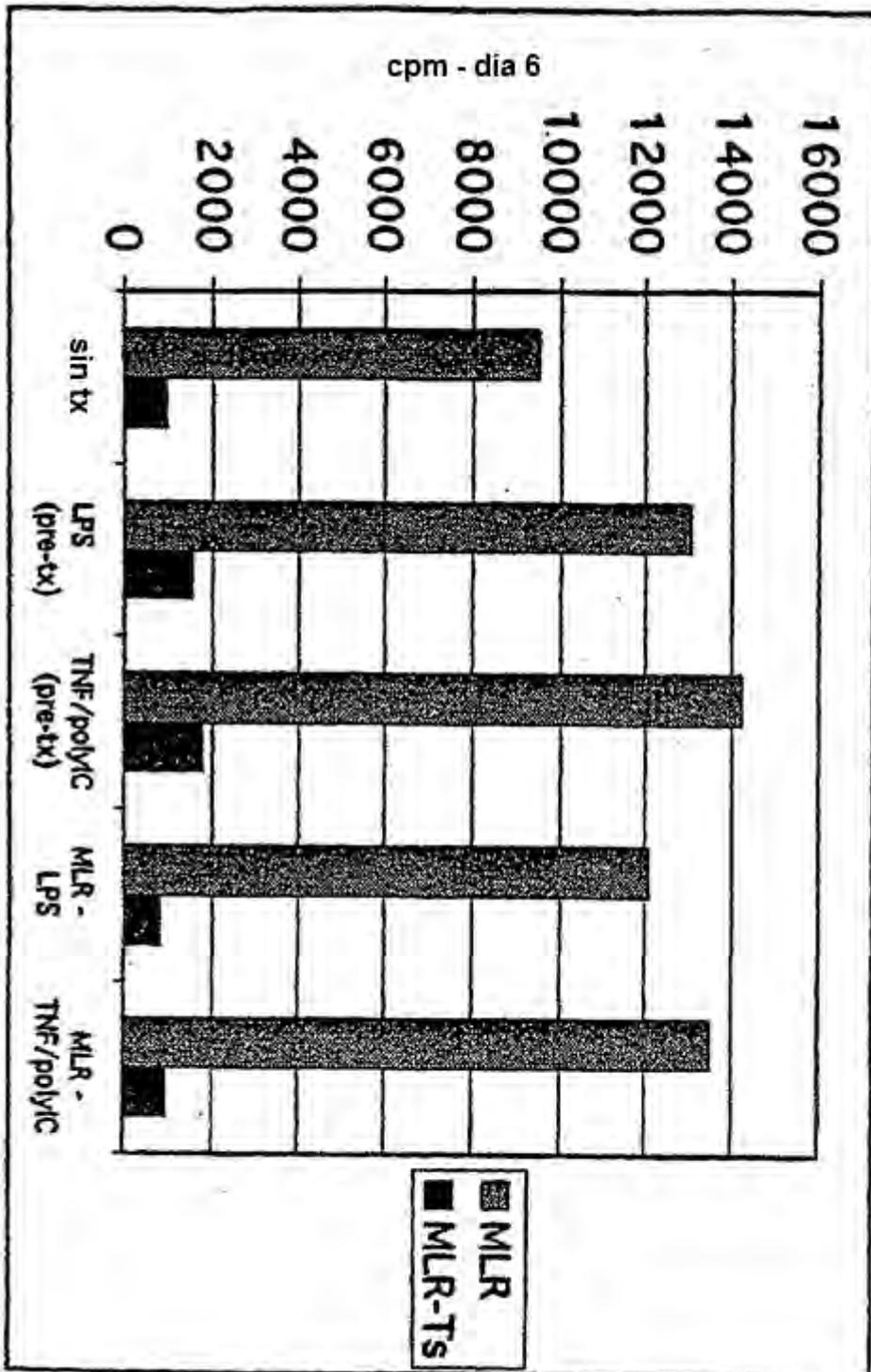
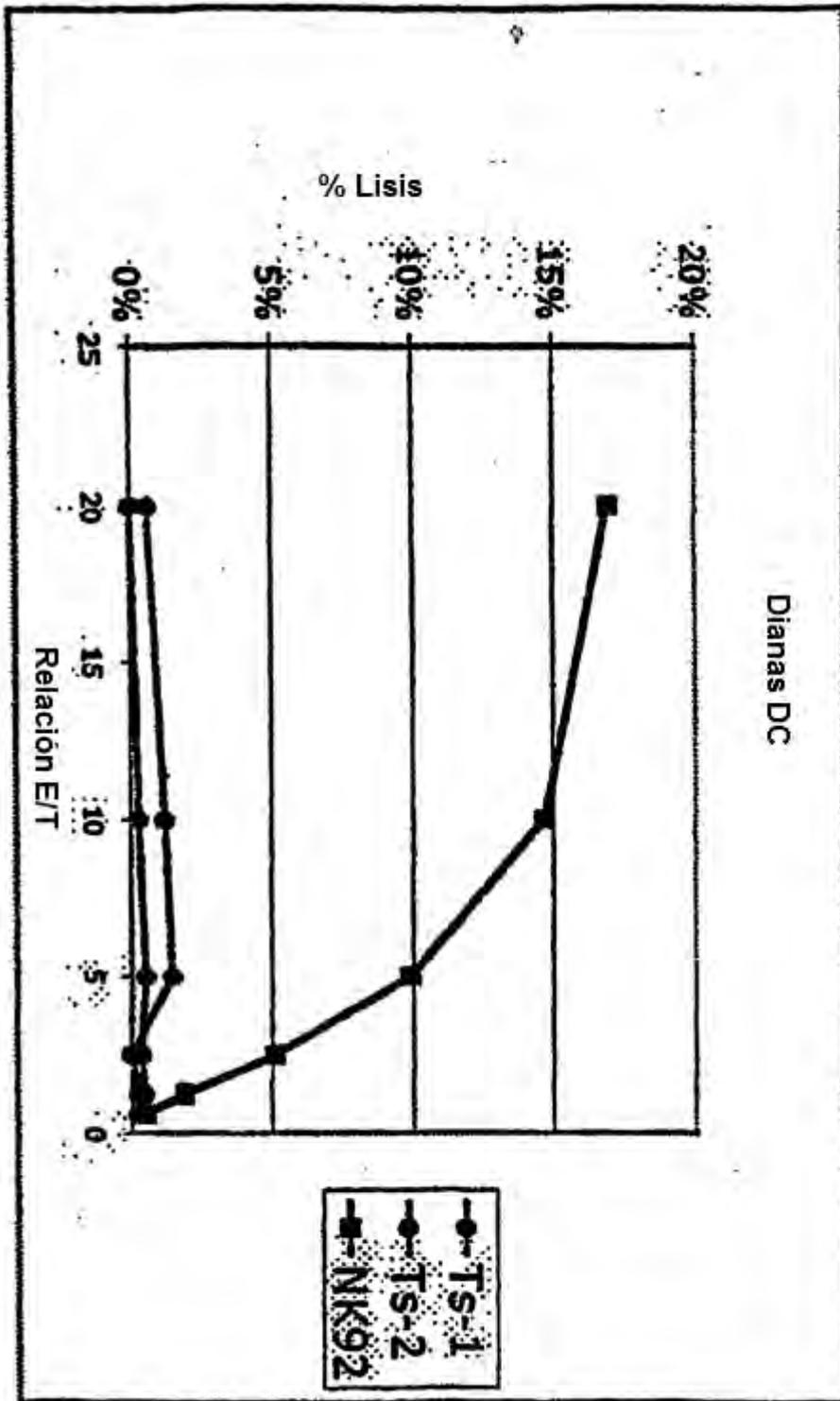


FIG. 20G





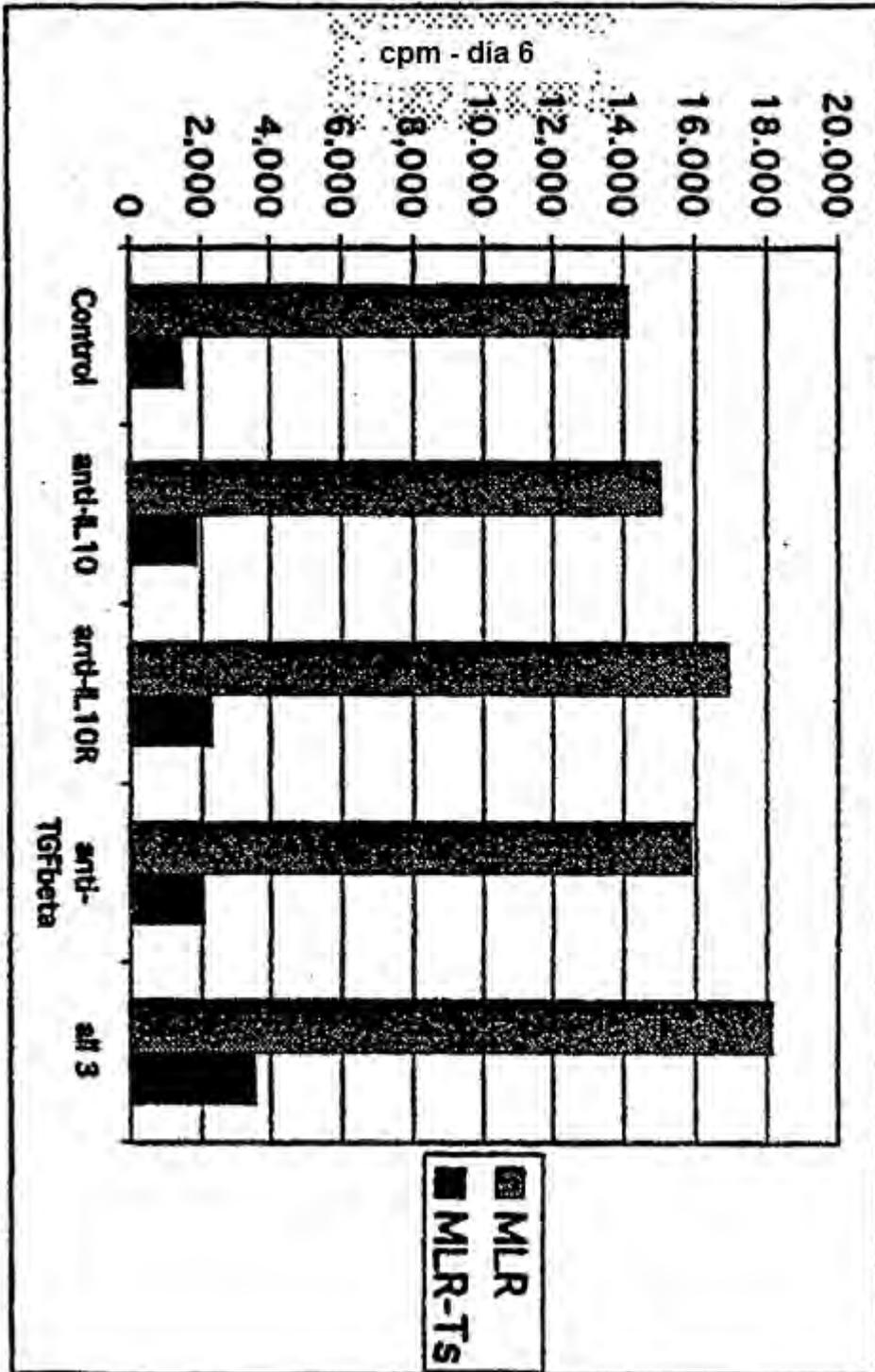


FIG. 21B

FIG. 21C

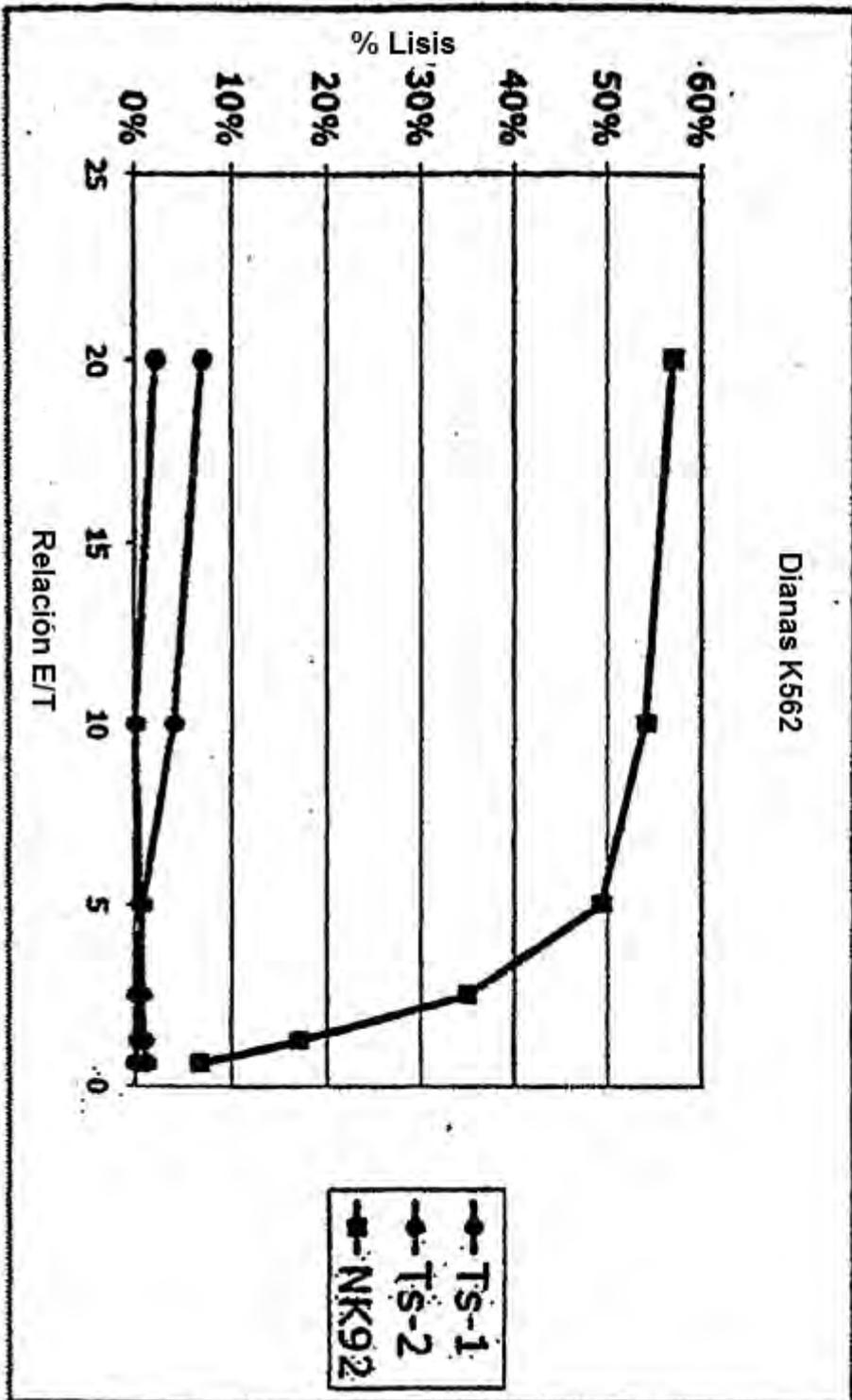


FIG. 21D

