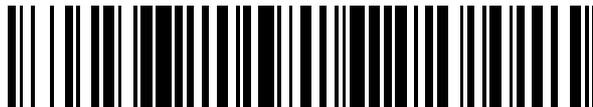


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 295**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

A61K 35/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2005** E 12177732 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** EP 2573166

54 Título: **Los métodos para preparar las células T para la terapia celular**

30 Prioridad:

26.02.2004 US 547966 P

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

13.10.2016

73 Titular/es:

**IMMUNOVATIVE THERAPIES, LTD. MALCHA
TECHNOLOGY PARK (100.0%)
Building No. 1, First Floor
Jerusalem 96951, IL**

72 Inventor/es:

HAR-NOY, MICHAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 586 295 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).

Los métodos para preparar las células T para la terapia celular**Descripción**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere a métodos para la generación de células T con capacidades inmunoestimulantes mejoradas para su uso en protocolos de tratamiento de terapia celular.

10 **[0002]** Los métodos de la terapia celular se han desarrollado con el fin de mejorar la respuesta inmune del huésped a los tumores, virus y patógenos bacterianos. Métodos de terapia celular a menudo implican la activación ex vivo y expansión de células T. Ejemplos de este tipo de tratamientos incluyen el uso de células de linfocitos de infiltración de tumores (TIL) (véase la Patente de EE.UU. nº 5.126.132 concedida a Rosenberg), las células T citotóxicas (véase Patente de Estados Unidos nº 6.255.073 expedida a Cai, et al.; y la patente de EE.UU. No. 5.846.827 expedida a Celis, et al.), células de nódulo linfático expandidas de drenaje de tumor (ver patente de EE.UU. nº 6.251.385 expedida a Terman), y varias otras preparaciones de linfocitos (véase la Patente de EE.UU. nº 6.194.207, concedida a Bell, et al.; Patente de Estados Unidos nº 5.443.983 expedida a Ochoa, et al.; patente de Estados Unidos nº 6.040.177 expedida a Riddell, et al.; patente de EE.UU. nº 5.766.920 expedida a Babbitt, et al.).

20 **[0003]** Para obtener la máxima eficacia de las células T en los protocolos de terapia celular, la población de células T activada ex vivo debe estar en un estado que puede orquestar al máximo una respuesta inmune al cáncer, enfermedades infecciosas, o de otros estados de enfermedad. Para una respuesta eficaz de las células T, las células T se debe activar. Para la activación, se requieren al menos dos señales para ser entregados a las células T. La primera señal se suministra normalmente a través del receptor de células T (TCR) en la superficie de células T. La primera señal de TCR es normalmente activar en la interacción del TCR con antígenos peptídicos expresados conjuntamente con un complejo de MHC en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC). La segunda señal se suministra normalmente a través de receptores coestimuladores en la superficie de células-T. Los receptores coestimuladores son generalmente activados por ligandos correspondientes o citocinas expresadas en la superficie de las APC.

30 **[0004]** Debido a la dificultad del mantenimiento de un gran número de APC natural en los cultivos de células T está preparado para su uso en protocolos de terapia celular, métodos alternativos se han buscado para la activación ex vivo de las células T. Un método es de evitar la necesidad de que el complejo de péptido-MHC en APCs naturales estimulando el TCR (primera señal) con activadores policlonales, tales como anticuerpos monoclonales anti-CD3 o anti-CD2 (mAbs) inmovilizados o reticulados o superantígenos. El agente de coestimulación más investigado (segunda señal) se utiliza junto con mAbs anti-CD3 o anti-CD2 ha sido el uso de mAbs anti-CD28 inmovilizados o solubles.

40 **[0005]** La combinación de mAb anti-CD3 (primera señal) y mAb anti-CD28 (segunda señal) inmovilizado sobre un soporte sólido tal como microesferas paramagnéticas (véase la patente de Estados Unidos nº 6.352.694 expedido a junio, et al.) se ha utilizado como sustituto por APCs naturales para inducir la activación de células T ex vivo en protocolos de terapia celular (Levine, Bernstein et al 1997; Garlie, LeFever et al. 1999; Shibuya, Wei et al., 2000). Si bien estos métodos son capaces de alcanzar poblaciones terapéuticamente útiles de células T, el uso de microesferas paramagnéticas hace que la facilidad de preparación de células T sea menos que ideal. Los problemas incluyen el alto costo de las microesferas, el proceso de uso intensivo de mano de obra para la eliminación de las microesferas anteriores a la celda de infusión, y la incapacidad de las microesferas para activar subconjuntos de CD8 de células T (Deeths, Kedl et al 1999; Laux, Khoshnan et al. 2000). Además, las poblaciones de células T resultantes de este método, y otros métodos de la técnica anterior de estimulación de células T, la falta del tipo de robustez requerida para provocar la estimulación inmunitaria eficaz cuando se infunde en los pacientes. Como consecuencia, no hay protocolos de terapia celular de la técnica anterior que se han demostrado significativamente eficaz en entornos clínicos.

50 **[0006]** Esto ha motivado la búsqueda de métodos más eficaces para la activación de las células T para su uso en protocolos de terapia celular. Uno de tales métodos es el uso de líneas de células tumorales de APC que han sido modificadas genéticamente para expresar los receptores que unen mAbs. Estos APC modificados pueden ser cargados con mAb anti-CD3 y anti-CD28 (Thomas, Maus et al. 2002) o adicionalmente modificados para expresar el ligando para 4-1 BB (Maus, Thomas et al. 2002) y después se usa para activar células T para su uso en protocolos de terapia celular. Se encontró que estas APCs modificadas dieron como resultado una activación más eficaz de las poblaciones de células T que el uso de CD3/CD28 recubierta de microesferas paramagnéticas. Sin embargo, el uso de líneas de células tumorales manipuladas genéticamente en los protocolos de terapia celular plantea problemas de seguridad que limitan la aplicación comercial de esta técnica. Otro método para la activación de células T se da a conocer en el documento WO 94/12196 A, en el que las microesferas poliméricas están unidas directamente a anti-CD28 y anticuerpos monoclonales anti-CD3.

65 SUMARIO DE LA INVENCION

5 [0007] En esta situación, los soportes biodegradables que comprenden microesferas o nanoesferas recubiertas con un primer material que es capaz de reticular el segundo materiales con reactividad a restos en la superficie de las células T se utilizan. Los soportes biodegradables recubiertos se mezclan entonces con células T segundo material marcado. Las señales entregadas por los segundos materiales reticulados se han mejorado por centrifugación de la mezcla. Las señales se pueden mejorar aún más por la cultura de la mezcla a altas densidades celulares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

10 [0008] Hay una necesidad de métodos de estimulación de células T mejorados capaces de incrementar la robustez de las células T para su uso en protocolos de terapia de células que son más adecuados para su uso en terapia humana.

15 [0009] Con el fin de mejorar la robustez de las células T, también es deseable que los métodos de estimulación mejorados imiten lo más cercanamente posible los efectos estimulantes de APCs naturales. La mejora en la activación de células T observada con las líneas de CD3/CD28 recubiertas de APC de células discutidas anteriormente (Thomas, Maus et al. 2002), se atribuyó a la disponibilidad de ligandos a moléculas co-estimuladoras expresadas de forma natural en la línea celular de APC que trabajaron en conjunto con la estimulación CD3/CD28. Estos ligandos incluyen B7-H3, PD-L1, PD-L2 y EL-15.

20 [0010] Por lo tanto, se desea tener un método para la estimulación de células T mejoradas capaces de presentar una multiplicidad de ligandos co-estimuladores sin el requisito para el uso de una línea celular de tumor.

25 [0011] APCs naturales, sin embargo, no sólo proporcionan múltiples estímulos simultáneos a las células T, que proporcionan diferentes conjuntos de múltiples estímulos en diferentes momentos y/o etapas en la respuesta de células T a la estimulación de células T. Ningunos métodos de estimulación de células T de técnica anterior son capaces de imitar este proceso natural.

30 [0012] La capacidad de imitar este proceso natural proporcionaría un medio para controlar no sólo la expansión de las células T, sino también la diferenciación de células-T. En el proceso de diferenciación de las células T en células efectoras o reguladoras, se requieren señales diferentes en diferentes momentos y/o etapas en la respuesta de células T a la estimulación de APC. Por lo tanto, sería deseable ser capaz de crear condiciones ex-vivo que imitan este proceso natural con el fin de proporcionar una mayor variedad de células diferenciadas para su uso en la terapia de células, incluyendo las células que, o bien podría estimular la inmunidad o suprimir la inmunidad.

35 [0013] El mantenimiento de los cultivos celulares de alta densidad utilizados en la presente invención requieren un cuidado especial, a la vez que la degradación de los soportes biológicos causa una caída en el pH de los medios y las densidades celulares más altas producen una rápida acumulación de productos metabólicos de desecho y el consumo de los nutrientes en el medio de cultivo. Por estas razones, se requieren cambios de los medios por lo menos diariamente y preferiblemente al menos dos veces al día después de que las células obtengan una densidad celular de más de 1 millón por ml.

45 [0014] Cambios de medio frecuentes pueden eliminar las citoquinas endógenas que son importantes para el mantenimiento y el crecimiento de los cultivos de células T. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, los medios de cultivo retirados se filtran a través de una membrana de diálisis con el fin de eliminar los productos de desecho metabólicos, pero retener citoquinas endógenas. Los medios retenidos entonces se suplementan con medios nutritivos frescos y se devuelven al cultivo mixto. Esto permite que las células se expongan a un medio nutritivo fresco sin dilución de las citoquinas endógenas.

50 [0015] A la vez que las células T crecen y maduran en los cultivos, diversas matrices de segundos materiales se pueden añadir a los cultivos en cualquier momento según se requiera y posteriormente se reticular mezclando con soportes biodegradables recubiertos adicionales. Alternativamente, los segundos materiales se pueden añadir a los soportes biodegradables y los soportes recubiertos se añaden en varias veces a los cultivos. La centrifugación de la mezcla cada vez después de añadir el segundo materiales adicionales y soportes biodegradables recubiertos proporciona un beneficio añadido. En realizaciones preferidas, la etapa de centrifugación se lleva a cabo todos los días para coincidir con la etapa de diálisis de medios.

Esferas biodegradables

60 [0016] Materiales poliésteres alifáticos, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), se prefieren los copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(caprolactona) (PCL), y polianhídridos para el uso como polímeros biodegradables para los soportes. Los polímeros pueden ser formulados como varias formas, tales como láminas, tiras, fibras, geles, nanoesferas o microesferas, y luego recubiertas con un primer material. Las microesferas son una formulación preferida, ya que pueden ser fabricados de forma reproducible en pequeños tamaños de partículas de microesferas de 1 a 500 micras, preferentemente de 1 a 10 micrómetros y lo más preferiblemente 1 a 5 micras.

65 Las microesferas de este intervalo de tamaños son capaces de inyección directa en el cuerpo por métodos convencionales. Se prefiere que las microesferas recubiertas pueden formular para degradarse en medios de cultivo

o fluidos fisiológicos dentro de los 14 días, más preferiblemente dentro de los 7 días, y más preferiblemente dentro de los 3 días. En otros métodos preferidos, nanoesferas se formulan. Estos dispositivos se prefieren en aplicaciones en las que, por ejemplo se requiere la degradación muy rápida 3 días o menos.

5 **[0017]** Un primer material preferido para el recubrimiento de las microesferas biodegradables es anticuerpos anti-ratón policlonales de cabra (u oveja) policlonal. A modo de ejemplo, este primer material preferente se puede utilizar para los anticuerpos derivados de ratón de reticulación monoclonales, o fragmentos o derivados de ingeniería genética de los mismos, que tienen especificidad para restos de superficie de células T. Así, por ejemplo, la mezcla de microesferas de cabra anti-ratón recubiertas (o nanoesferas), con células T humanas marcadas con el ratón anti-CD3 humano y mAbs CD28 de ratón anti-humano causará la reticulación de los mAbs de ratón en las células T humanas a través de la unión del anticuerpo policlonal anti-ratón de cabra con los mAbs de ratón. La reticulación de la mAbs causará la activación y proliferación de las células T. Muchas combinaciones de primeros materiales y segundos materiales se pueden utilizar para lograr el objetivo de los segundos agentes de reticulación unidos a restos de superficie de las células T con el fin de iniciar la transducción de señales y la activación de células T.

15 **[0018]** Las microesferas recubiertas biodegradables (o nanoesferas) utilizadas en la presente invención proporcionan muchas ventajas para la preparación de las células T para su uso en protocolos de terapia celular sobre los métodos de la técnica anterior donde los agentes mitogénicos se inmovilizan sobre una superficie sólida, tal como microesferas paramagnéticas:

20 En primer lugar, al ser los dispositivos biocompatibles y, naturalmente, se degradan en sustancias no tóxicas, no hay necesidad de establecer un proceso de eliminación de talón.

25 En segundo lugar, debido a que los dispositivos tienen una baja densidad, pueden ser utilizados con células que están siendo sometidos a una fuerza centrífuga. Dispositivos de la técnica anterior, tales como microesferas paramagnéticas, causa daño a las células cuando se sometieron a centrifugación. La capacidad para centrifugar las células con las microesferas permite el uso de la fuerza centrífuga para mejorar la calidad de las señales proporcionadas a las células T por los ligandos estimuladores reticulados en la superficie de las células T y también proporciona un medio para lavar y procesar las células T para la preparación de la infusión.

30 En tercer lugar, en un uso de la presente invención, en lugar de inmovilizar las células T de ligandos estimuladores y co-estimuladoras a una superficie sólida para presentar señales a las células T, el uso de microesferas biodegradables recubiertas (o nanoesferas) permite que los ligandos se apliquen primero a las células T y, a continuación las células T marcadas se mezclan con las microesferas biodegradables recubiertas (o nanoesferas). De esta manera, las microesferas recubiertas (o nanoesferas) actúan como un agente de reticulación universal.

35 En cuarto lugar, como un agente de reticulación universal, una multiplicidad de ligandos estimuladores y co-estimuladores se puede aplicar a las células T y se reticulan por las microesferas recubiertas y la composición de la multiplicidad de ligandos estimuladores y coestimuladores se reticulan se puede variar con el tiempo.

40 En quinto lugar, la capacidad de variar la composición de la matriz de señales estimuladoras y coestimuladoras proporcionadas a las células T en el tiempo permite la práctica de métodos diseñados para imitar la presentación natural de la proliferación de células T, la diferenciación y señales funcionales.

45 En sexto lugar, la capacidad de imitar la presentación de señal natural para las células T permite el desarrollo de las células T con una multitud de características funcionales para su uso en protocolos de terapia celular.

En séptimo lugar, la capacidad de controlar la secuencia y la variedad de señales suministradas a las células T en el tiempo permite un medio para controlar las vías de diferenciación de las células T ex vivo. Esto permitirá que la experimentación con nuevas combinaciones y secuencia de las señales entregadas a las células T. Tales métodos dará lugar a productos de células T con nuevas funciones efectoras tanto estimulantes y supresoras para su uso en protocolos de terapia celular.

50 **[0019]** Para los fines de la presente invención, todas las referencias a las células T incluye una población de células con al menos una parte de las células que contienen células T. Las células T son células que expresan TCR, incluyendo TCR α/β y γ/δ . Las células T incluyen todas las células que expresan CD3, incluyendo subconjuntos de células T, que también expresan CD4 y CD8. Las células T incluyen tanto células ingenuas y de memoria y células efectoras tales como CTL. Las células T también incluyen células reguladoras como células Th1, Tc1, Th2, Tc2, Th3, Treg, y Tr1. Las células T también incluyen células NKT y clases únicas similares del linaje de células T.

55 **Transducción de señales aumentadas**

60 **[0020]** Un aspecto de la presente invención proporciona métodos para la estimulación mejorada de una población de células T por la concentración de una mezcla de material de primeras microesferas biodegradables recubiertas (o nanoesferas) y segundas células T marcadas de material. Con el fin de aumentar la eficacia de la señal transducida a las células T, es importante tanto para aumentar la cantidad de segundos agentes reticulados y la calidad de la reticulación.

65 **[0021]** Con el fin de asegurar la más alta cantidad de segundos materiales que están asociados con los correspondientes restos de superficie en la superficie de las células T, el etiquetado de las células T debería llevarse a cabo con el segundo material en exceso. En una realización preferida en la que mAbs de ratón a los antígenos de superficie de células T humanas son los segundos materiales, los mAbs se mezclan preferiblemente con una

suspensión de células T mediante el cual las células T son a una concentración de 1×10^6 a 1×10^7 por ml y cada mAb está a una concentración de 0,5 m/ml a 10 ml/ml, preferiblemente de 1 ml/ml. Las células T marcadas deben mezclarse con las esferas biodegradables recubiertas en una proporción de al menos una esfera por célula, y preferiblemente en una proporción de 3 esferas por célula.

[0022] Con el fin de asegurar la más alta calidad de la reticulación, las células marcadas y las esferas biodegradables recubiertas se mezclan primero a fondo y después se concentró juntos bajo la fuerza centrífuga. La centrifugación preferiblemente se realiza cada 3 días, más preferiblemente al menos una vez al día. También es preferiblemente que las células T se mantuvieron a 4°C desde el momento en que se añaden nuevos mAbs a través de la terminación de la centrifugación. Mantener las células a temperatura de refrigeración evita que la nivelación y derramamiento de los receptores de superficie de células T ligadas antes de ser reticuladas.

Métodos de cultivo celular

[0023] Es preferible mantener transducción de señales TCR procesiva y sostenida y co-simulación con el fin de ofrecer las más robustas células T para su uso en protocolos de terapia celular. Por esta razón, los métodos de la presente invención funcionan mejor cuando se mantienen las células T cultivadas en altas densidades de células, tales como mayor que 10^6 células/ml, o más preferiblemente mayor que 10^7 células/ml, o más preferiblemente mayor que 10^8 células/ml. Las altas densidades de células aumentan la interacción célula:células y la interacción con las esferas biodegradables.

[0024] El aumento de la interacción de células:células tiene un efecto beneficioso que es independiente del efecto de reticulación de las esferas biodegradables. El efecto beneficioso proviene de la expresión de los ligandos estimuladores que regulan al alza en la superficie de las células T en respuesta a las condiciones máximas de activación. Estos ligandos interactúan con los receptores correspondientes en otras células T. Por ejemplo, las células T expresarán uno o más de los ligandos co-estimuladores después de TNFR tales como la LIGHT, CD70, OX40L, 4-1BBL y CD30L después de la activación máxima.

[0025] El mantenimiento de las células a altas densidades en cultivo con las esferas biodegradables requiere el cambio frecuente de los medios de cultivo. Las altas densidades de células dan lugar a una alta tasa de acumulación de productos metabólicos de desecho y el consumo de los nutrientes disponibles. Además, la hidrólisis de las esferas biodegradables hace que el pH del medio de cultivo se convierta en ácido. Demasiados medios rápidos de reemplazo, sin embargo, pueden ser perjudiciales para los cultivos en los que no se utilizan citoquinas exógenas. Es preferible no utilizar citoquinas exógenas en el tratamiento de las células para su uso en protocolos de terapia celular, como citoquinas exógenas pueden ser tóxicas cuando se infunde en los seres humanos y puede hacer que las células cultivadas sean dependientes en la presencia de las citoquinas exógenas para la viabilidad. Por lo tanto, los métodos de la presente invención incluyen una etapa de diálisis en el procesamiento celular.

[0026] La diálisis del medio de cultivo con un tamaño de poro de la membrana de 10.000 dalton o menos permitirá a la retención de citocinas endógenas, mientras que permite el paso de los desechos metabólicos. En realizaciones preferidas, la mitad del medio de cultivo de un cultivo se retira diariamente y 90% pasó a través de un filtro de diálisis. Los medios pasan a través del filtro se desecha, mientras que los medios retenidos se alza hasta el volumen original con medio de cultivo fresco.

[0027] De acuerdo con el método de la presente invención, se describe un procedimiento para la producción de células T con la robustez y la función mejoradas para su uso en protocolos de terapia celular que implica: (1) el etiquetado de una población de células T con uno o más agentes que tienen reactividad a restos de la superficie celular; (2) de mezcla de la población de células T marcadas con esferas biodegradables recubiertas capaces de reticular los agentes unidos a restos de la superficie celular en las células T que causan una señal que se transduce a las células T; (3) la concentración de la mezcla por centrifugación; (4) la continuación del cultivo de las células T en una alta densidad celular; y (5) la eliminación de los medios de los cultivos al menos diariamente y la diálisis de los medios para la retención de las citoquinas endógenas y reemplazo con medio fresco; y (6) la repetición del proceso según sea necesario con los mismos o diferentes agentes para el etiquetado de las células T con el fin de generar tanto las cantidades de células T necesarias para la infusión y la función óptima de las células T para el efecto clínico.

Elección de los objetivos ligados de células T

[0028] La capacidad de diseñar métodos de activación de células T más eficiente y eficaz, expansión y diferenciación será un resultado directo de la selección y el momento de aplicación de segundos materiales. Segundos materiales son agentes que son capaces de ligar restos de superficie de células T y la entrega de una señal a la célula T sobre la reticulación. Estos materiales son preferiblemente anticuerpos monoclonales, o fracciones o versiones manipuladas genéticamente de los mismos, tales como proteínas de fusión. La selección de los segundos materiales será como resultado de la comprensión de la activación de células T, la expansión y el proceso de diferenciación y los requisitos para el tipo y la duración de las señales en un momento de la vida de las células T de contestación.

[0029] Se sabe que al menos dos tipos de receptores necesitan ser contratados para la activación de células T, el TCR y un estimulador de cooperación (Chambers y Allison 1999). En respuesta al acoplamiento natural de APC con el péptido antigénico y ligandos coestimuladores, el sitio de contacto de la APC y las formas de las células T de un "sinapsis inmunológica". La sinapsis se ensambla en las regiones topológicamente y espacialmente distintas. El acoplamiento inicial TCR se produce en la periferia de la sinapsis (Grakoui, Bromley et al. 1999) después de lo cual el compromiso de ligando de moléculas co-simuladoras tales como CD28, CD2, CD48 y LFA-1 facilita la manipulación y re-disposiciones de receptores en la sinapsis. El contenido de las moléculas en la sinapsis puede ser enriquecido específicamente en un subconjunto de proteínas y puede excluir selectivamente proteínas. Este movimiento selectivo de las proteínas se ve facilitado por las estructuras conocidas como "balsas lipídicas".

[0030] Es conocido que la partición de membrana de balsa lipídica es crucial para la óptima transducción de señales TCR (Moran y Miceli 1998; Janes, Ley et al., 1999) y co-estimuladores a la señalización TCR causan la formación de sinapsis y la re-organización y agrupación de balsas de lípidos en la sinapsis. Estos eventos proporcionan un mecanismo natural para la integración de la información espacial y temporal proporcionadas a las células T del medio ambiente.

[0031] En consecuencia, el conocimiento de los tipos de receptores disponibles en la sinapsis en respuesta a estímulos definidos puede proporcionar la información para decidir los diversos tipos de co-estimuladores para que se utilice durante un período de tiempo. Las balsas de lípidos funcionan como plataformas para la concentración y la yuxtaposición de transductores de señales TCR asociados y montaje de un complejo de señalización TCR organizada. Por lo tanto, por un proceso de proporcionar primero una matriz definida de señales a una población de células T y después el análisis de las proteínas ensambladas en las balsas de lípidos que fueron inducidas por la primera matriz, un segundo conjunto de posibles señales se puede determinar. El proceso se puede repetir con segundos estimuladores de matriz. Después de la aplicación de la segunda matriz, el proceso se puede repetir con una tercera matriz y así sucesivamente. En cada paso en el proceso, la respuesta de las células T se puede controlar con el fin de optimizarse para la función deseada, tal como la proliferación, los tipos y las cantidades de la producción de citoquinas seleccionadas, la expresión de moléculas efectoras y otras moléculas de superficie funcionales.

[0032] Por ejemplo, tanto CD2 y LFA-1 son proteínas asociadas a balsa que pueden estimular la activación inicial de células T en el ausencia de CD28 (Yashiro-Ohtani, Zhou et al. 2000). Es conocido que el acoplamiento de estas moléculas por regulación al alza y el aumento de la avidéz por los receptores de ICAM-1 que después podrían ser llamados a ejercer una segunda matriz. Se conoce que el acoplamiento CD2/LFA-1 facilita que la activación de las células T aumente el número de los TCR que participan en el tiempo, mientras que las funciones de CD28 mediante el aumento de la potencia de los TCR que se participan, reduciendo así el número de los TCR que necesitan ser dedicados con el fin de efectuar una respuesta (Bachmann, McKall-Faienza et al. 1997).

[0033] En realizaciones preferidas, una primera matriz incluyendo CD3 y otras moléculas co-estimuladoras seleccionadas de uno o más de los siguientes: CD2, CD28, CD48, LFA-1, CD43, CD45, CD4, CD8, CD7, GM1, LIGHT (proteína de fusión HVEM) se utiliza. Un segundo conjunto incluyendo CD3 y uno o más de los coestimuladores de primer ensayo con las opciones adicionales de los siguientes ligandos inducibles co-estimuladores: CD27, OX40, 4-1BB y CD30.

[0034] También en realizaciones preferidas, los receptores de contador de células T a diversas moléculas de adhesión se puede activar durante el proceso. Ejemplos de moléculas de adhesión en las células T son: CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-selectina), y CD29/CD49d (VLA-4). Otros agentes de matriz segundos adecuados incluyen agentes no citocinas que se unen a los receptores de citoquinas y entregar una señal cuando se reticula. Ejemplos de este tipo de agentes son mAbs a receptores de citoquinas, incluyendo: IL-2R, IL-4R, IL-10R, Tipo II IFNR1 y R2, Tipo I IFNR, IL-12Rbeta1 y beta2, IL-15R, TNFR1 y TNFR2, y IL-1R también cualesquiera agentes capaces de unirse a los receptores de quimiocinas en las células T y la entrega de una señal cuando se reticula, incluidos en las categorías C-C y C-X-C. Los ejemplos de receptores de quimiocinas asociadas con la función de las células T incluyen CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR3 y

Ejemplo Métodos

[0035] Los ejemplos de procesos optimizados para la producción de una población de células T con una mayor capacidad de estimular el sistema inmunológico siguen. Todos los ejemplos utilizan microesferas biodegradables recubiertas de cabra anti-ratón y las células T marcadas con mAbs de ratón específicos para los antígenos de superficie de células T:

Ejemplo # 1:

[0036]

Ensamblaje (Día 0)

ES 2 586 295 T3

- (1) colección de leucocitos por leucaféresis;
- (2) purificación de 10^8 CD4+ T-células por selección positiva;
- (3) el etiquetado de las células CD4+ purificadas con anti-CD3, anti-CD28 y anti-IL-12Rbeta2 mAbs;
- (4) mezclar las células marcadas con microesferas recubiertas en bolsas permeables de gas (3:1 esfera:célula);
- (5) la suspensión de la mezcla a una densidad celular de 1×10^6 /ml en 100 ml;
- (6) la centrifugación de la mezcla a 500 x g durante 8 min a 4°C;
- (7) resuspender suavemente la cultura en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂;

Día 3

- (8) retirar 80 ml de medio de cultivo por aspiración de la jeringa usando un filtro de 0,45 micras a fin de no eliminar cualquier célula;
- (9) pasan 70 ml de los medios retirados a través de un filtro de diálisis de 6.000 Dalton de tamaño de corte;
- (10) Agregar 70 ml de medio de cultivo fresco a los 10 ml retenidos y añadir de nuevo a la bolsa de cultivo;
- (11) añadir 100 µg cada uno de anti-CD3, anti-CD28, anti-IL-12Rbeta2 y anti-de 4-1BB mAbs a la bolsa de cultivo;
- (12) mezclar microesferas recubiertas en una relación de esfera:células de 1:1;
- (13) mezcla centrífuga a 500 x g durante 8 min a 4°C;
- (14) resuspender suavemente la cultura en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂;

Día 4

- (15) repita los pasos 8-10

Día 5

- (16) repita los pasos 8-10

Día 6

- (17) repita los pasos 8-14
- (18) después de 12h, repita los pasos 8-10

Día 7

- (19) repita los pasos 8-10
- (20) después de 12h, repita los pasos 8-10

Día 8

- (21) repita los pasos 8-10
- (22) después de 12h, repita los pasos 8-10

Día 9

- (23) cosecha la población de células T y formula para infusión

Resultados

[0037] Este método resulta en una población de células T con una mayor proliferación y la producción de IFN-gamma y TNF-alfa en comparación con las células activadas con microesferas inmunomagnéticas revestidas de CD3/CD28 independientemente. N = 6

Método	Expansión de pliegue	IFN-gamma ng/ml	TNF-alfa ng/ml	IL-4 pg/ml
Ejemplo #1	830+/-77	970+/-160	180+/-38	< 20
3/28-beads + IL-2	80+/-20	3+/-2,2	0,5+/-,2	80+/-16

Ejemplo # 2

[0038]

Ensamblaje (Día 0)

- (4) colección de leucocitos por leucaféresis;
- (5) purificación de 10^8 CD4 + T-células por selección positiva;

ES 2 586 295 T3

- (6) el etiquetado de las células CD4+ purificadas con anti-CD3, anti-CD28 mAbs;
(4) mezclar las células marcadas con microesferas recubiertas en gas bolsas permeables (3:1 esfera:célula);
(5) la suspensión de la mezcla a una densidad celular de 1×10^6 /ml en 100 ml;
(6) la centrifugación de la mezcla a 500 x g durante 8 min a 4°C;
(7) resuspender y la cultura en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂ con cuidado;

Día 3

- (8) retirar 80 ml de medio de cultivo por aspiración de la jeringa usando un filtro de 0,45 micras a fin de no eliminar cualquier célula;
(9) pasar 70 ml de los medios retirados a través de un filtro de diálisis de 6.000 Dalton de tamaño de corte;
(15) añadir 70 ml de medio de cultivo fresco a los 10 ml retenidos y añadir de nuevo a la bolsa de cultivo;
(16) añadir 100 mg cada una de anti-CD3 y anti-CD28, anticuerpos monoclonales a la bolsa de cultivo;
(17) mezcla de microesferas en una relación de esfera:células revestida de 1:1;
(18) mezcla se centrifuga a 500 x g durante 8 min a 4°C;
(19) Resuspender suavemente el cultivo en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂;

Día 4

- (15) repita los pasos 8-10

Día 5

- (16) repita los pasos 8-10

Día 6

- (24) repita los pasos 8-14
(25) después de 12h repita los pasos 8-10

Día 7

- (26) repita los pasos 8-10
(27) después de 12h repita los pasos 8-10

Día 8

- (28) repita los pasos 8-10
(29) después de 12h, repita los pasos 8-10

Día 9

- (30) cosecha la población de células T y formula para infusión

Resultados

[0039] Este método resulta en una población de células T con una mayor proliferación y la producción de IFN-gamma y TNF-alfa en comparación con las células activadas con microesferas inmunomagnéticas revestidas de CD3/CD28 solo, así como una mayor expresión de CD40L. N = 6

Método	Expansión de pliegue	IFN-gamma ng/ml	TNF-alfa ng/ml	CD40L %
Ejemplo #2	630+/-77	90+/- 16.7	8.8+/-1.3	78.5+/-10
3/28-microesferas + IL-2	80+/-20	3+/-2,2	0,5+/- .2	15+/-16

Ejemplo # 3

[0040]

Ensamblaje (Día 0)

- (7) colección de leucocitos por leucaféresis;
(8) purificación de 10^8 CD4+ T-células por selección positiva;

ES 2 586 295 T3

- (9) el etiquetado de células CD4+ purificadas con anti-CD3, anti-CD28 y anti-Hvem mAbs;
(4) mezclar las células marcadas con microesferas recubiertas en gas de bolsas permeables (3:1 esfera:célula);
(5) la suspensión de la mezcla a una densidad celular de 1×10^6 /ml en 100 ml;
(6) la centrifugación de la mezcla a 500 x g durante 8 min a 4°C;
5 (7) resuspender suavemente y el cultivo en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂;

Día 3

- 10 (8) retirar 80 ml de medio de cultivo por aspiración de la jeringa usando un filtro de 0,45 micras a fin de no eliminar cualquier célula;
(9) pasar 70 ml de los medios retirados a través de un filtro de diálisis de 6.000 Dalton de tamaño de corte;
(20) Agregar 70 ml de medio de cultivo fresco al retenido 10 ml y añadir de nuevo a la bolsa de cultivo;
(21) añadir 100 mg cada una de anti-CD3 y anti-CD28, anti-CD27 y anti-mAbs de 4-1BB a la bolsa de cultivo;
15 (22) mezcla microesferas revestidas en una relación células:esfera de 1:1;
(23) mezcla se centrifuga a 500 x g durante 8 min a 4°C;
(24) Resuspender suavemente y el cultivo en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂;

Día 4

- 20 (15) repita los pasos 8-10

Día 5

- 25 (16) repita los pasos 8-10

Día 6

- 30 (31) repita los pasos 8-14
(32) después de 12h, repita los pasos 8-10

Día 7

- 35 (33) repita los pasos 8-10
(34) después de 12h, repita los pasos 8-10

Día 8

- 40 (35) repita los pasos 8-10
(36) después de 12h, repita los pasos 8-10

Día 9

- 45 (37) repita los pasos 8-10;
(38) después de 12h, repita los pasos 8-10;
(39) añadir 100 µg cada una de anti-CD3 y anti-CD28, y HVEM-Fc a la bolsa de cultivo;
(40) mezcla de microesferas revestidas en una relación de esfera:células de 1:1;
(41) mezcla se centrifuga a 500 x g durante 8 min a 4°C;
(42) Resuspender suavemente el cultivo en atmósfera húmeda a 37°C con 5% de CO₂;

50 Día 10

- (43) repita los pasos 8-10;
(44) después de 12h, repita los pasos 8-10;

55 Día 11

- (45) cosecha la población de células T y formula para infusión.

Resultados

- 60 **[0041]** Este método resulta en una población de células T con una mayor proliferación y la producción de IFN-gamma LIGHT y FasL en comparación con las células activadas con microesferas inmunomagnéticas revestidas de CD3/CD28 solamente. N = 6

65

Método	Expansión de pliegue	IFN-gamma ng/ml	LIGHT (%)	FasL %
Ejemplo #3	290+/-21	44+/- 6.2	38.4+/-3.3	61.4+/-10
3/28-microesferas + IL-2	80+/-20	3+/-2,2	6.1+/-5	4+/-1.3

REFERENCIAS CITADAS

[0042]

Bachmann, M. F., K. McKall-Faienza, et al. (1997). "Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation." *Immunity* 7(4): 549-57.

Chambers, C. A. y J. P. Allison (1999). "Costimulatory regulation of T cell function." *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 203-10.

Deeths, M. J., R. M. Kedl, et al. (1999). "CD8+ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation." *J Immunol* 163(1): 102-10.

Garlie, N. K., A. V. LeFever, et al. (1999). "T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer." *J Immunother* 22(4): 336-45.

Grakoui, A., S. K. Bromley, et al. (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." *Science* 285(5425): 221-7.

Janes, P. W., S. C. Ley, et al. (1999). "Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor." *J Cell Biol* 147(2): 447-61.

Laux, I., A. Khoshnan, et al. (2000). "Response differences between human CD4(+) and CD8(+) T-cells during CD28 costimulation: implications for immune cell-based therapies and studies related to the expansion of double-positive T-cells during aging." *Clin Immunol* 96(3): 187-97.

Levine, B. L., W. B. Bernstein, et al. (1997). "Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4+ T cells in the absence of exogenous feeder cells." *J Immunol* 159(12): 5921-30.

Maus, M. V., A. K. Thomas, et al. (2002). "Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB." *Nat Biotechnol* 20(2): 143-8.

Moran, M. y M. C. Miceli (1998). "Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation." *Immunity* 9(6): 787-96.

Shibuya, T. Y., W. Z. Wei, et al. (2000). "Anti-CD3/anti-CD28 bead stimulation overcomes CD3 unresponsiveness in patients with head and neck squamous cell carcinoma." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126(4): 473-9.

Thomas, A. K., M. V. Maus, et al. (2002). "A cell-based artificial antigen-presenting cell coated with anti-CD3 and CD28 antibodies enables rapid expansion and long-term growth of CD4 T lymphocytes." *Clin Immunol* 105(3): 259-72.

Yashiro-Ohtani, Y., X. Y. Zhou, et al. (2000). "Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts." *J Immunol* 164(3): 1251-9.

Reivindicaciones

1. Un método para la activación de células T que comprende:

5 proporcionar un soporte biodegradable, que comprende microesferas o nanoesferas, con un primer material adjunto capaz de reticular segundos materiales, los segundos materiales que son capaces de restos en la superficie de las células T de unión; proporcionar al menos un segundo material unido a restos en la superficie de las células T; mezclando el soporte con el primer material unido con al menos un segundo material unido a restos en la superficie de las células T de modo que el primer material reticula el segundo material y el segundo material entrega una señal a las células T para provocar la activación de las células T; y centrifugación de la mezcla para mejorar la reticulación.

2. El método de la reivindicación 1 en el que el primer material comprende anticuerpos policlonales.

15 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que los segundos materiales incluyen proteínas mitogénicas, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión y agentes capaces de unirse a los receptores de quimiocinas.

20 4. El método de la reivindicación 3 en el que las proteínas mitogénicas incluyen anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD2.

25 5. El método de la reivindicación 1, que comprende además la adición de uno o más segundos materiales en un momento posterior en las células T de respuesta para causar una mayor diferenciación de las células T, en el que al menos uno de los segundos materiales añadidos es diferente que al menos uno de los segundos materiales en la etapa de mezcla.

30

35

40

45

50

55

60

65