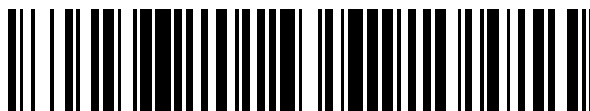


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 678**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2011** **PCT/IL2011/000727**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012** **WO12032526**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2011** **E 11773325 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2613801**

54 Título: **Uso de linfocitos T de memoria central anti-terceros para el tratamiento anti-leucemia/linfoma**

30 Prioridad:

08.09.2010 US 380716 P

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

15.11.2016

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**REISNER, YAIR;
LASK, ASSAF;
OPHIR, ERAN;
OR-GEVA, NOGA;
COHEN, ADVA;
AFIK, RAN;
BACHAR-LUSTIG, ESTHER y
EIDELSTEIN, YAKI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 589 678 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

Uso de linfocitos T de memoria central anti-terceros para el tratamiento anti-leucemia/linfoma

5 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células anti-terceros que no inducen la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que comprenden un fenotipo de linfocito T de memoria central y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de las mismas para el tratamiento de injerto contra leucemia/linfoma.

10 Las opciones de tratamiento para pacientes con neoplasias malignas hematológicas tales como linfoma no Hodgkin (NHL) son muchas y variadas. Estos protocolos de tratamiento modernos conducen a remisión completa (RC) en una proporción considerable de los pacientes. Sin embargo, muchos de estos pacientes recaen finalmente, lo que implica que las células tumorales residuales permanecen en los pacientes que logran una RC clínica. Para tratar este problema, la infusión de linfocitos donantes (DLI) dotada con reactividad de injerto contra leucemia/linfoma (GVL) está siendo actualmente desarrollada. En particular, se han hecho progresos en el contexto del trasplante alogénico de médula ósea (BMT) en conjunción con DLI después del trasplante [Grigg A y Ritchie D, Biol Blood Marrow Transplant (2004) 10: 579-590]. De esta manera, se ha mostrado que los linfocitos T CD8+ donantes presentes en el injerto de células madre o en la DLI tienen el beneficio adicionado de efecto GVL que puede destruir células malignas residuales [Ho WY y colaboradores, J Clin Invest. (2002) 110: 1415-1417]. Sin embargo, este beneficio se anula por la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), asociada con linfocitos T CD8, que afectan adversamente a la mortalidad relacionada con el trasplante.

25 El trabajo previo realizado por los presentes inventores ha mostrado que la estimulación ex vivo de linfocitos T CD8 + murinos contra estimuladores de terceros, bajo privación de IL-2, conduce al crecimiento selectivo de clones de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ restringidos de terceros que pueden facilitar la incorporación del injerto BMT agotado de linfocitos T (TDBMT) sin provocar GVHD [Bachar-Lustig E. y colaboradores, Blood (2003) 102:1943-1950; Reich-Zeliger S. y colaboradores, Immunity (2000) 13: 507-515]. Recientemente, los presentes inventores mostraron que los linfocitos CD8+ anti-terceros activados con fenotipo de memoria central (Tcm), pueden soportar adicionalmente y mejorar el injerto de médula ósea (BM), probablemente debido a la migración al nodo linfático mejorada de los linfocitos Tcm, su capacidad proliferativa y persistencia prolongada en receptores de BMT [Ophir E y colaboradores, Blood (2010) 115: 20.95-2104].

35 Adicionalmente, los presentes inventores han mostrado que en humanos, los CTL anti-terceros, aunque agotados de alorreactividad, muestran una potente destrucción *in vitro* de B-CLL y diferentes tipos de células de linfoma primario [Lask A y colaboradores (presentado 2010); Arditti FD y colaboradores, Blood (2005) 105:3365-3371]. Se mostró que esta forma única de GVL es independiente del reconocimiento del TCR y se descubrió que está mediada tanto por CTL anti-terceros autólogos como alogénicos. Adicionalmente, esta destrucción independiente de TCR de neoplasias malignas de linfocitos B por CTL anti-terceros se mostró que estaba mediada por una rápida adhesión a través del enlace ICAM1-LFA1, seguido por la lenta inducción de apoptosis en una interacción crítica entre CD8 en el CTL y el MHC clase I en la célula tumoral. Por otra parte, se mostró que la destrucción es independiente de las moléculas de muerte de CTL clásicas: FASL, perforina, TNF y Trail [Lask A y colaboradores, supra].

La técnica adicional incluye los documentos WO/2010/049935, WO 2007/023491 y WO 01/49243.

45 Kawai Tatsuo y colaboradores se refiere a un trasplante renal HLA no compatible sin inmunosupresión de mantenimiento, New England Journal of Medicine, Massachussets Medical Society, Boston, MA, Estados Unidos, vol. 358, N° 4, 24 de enero de 2008, páginas 353-361.

50 Ophir E y colaboradores se refiere a la inducción de tolerancia en receptores de órganos mediante trasplante de células madre hematopoyéticas, International Immunopharmacology, Elsevier, Ámsterdam, NL, vol. 9, n° 6, 1 de junio 2009, páginas 694-700.

Sumario de la invención

55 La presente invención se refiere a un método de generación de una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), comprendiendo dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) el distintivo CD8⁺/CD62L⁺/CD45RO⁺ y en el que al menos el 50 % de la población de células aislada tienen dicho distintivo, siendo dichas células, células que inducen tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante, comprendiendo el método:

65 (a) poner en contacto las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21 en condiciones que permiten la eliminación de las células reactivas GVH; y
(b) cultivar dichas células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-15 en un entorno libre de antígeno en condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), generando de ese modo la población de células aislada.

La presente invención se refiere también a una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), comprendiendo dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) el distintivo CD8⁺/CD62L⁺/CD45RO⁺ y en el que al menos el 50 % de la población de células aislada tienen dicho distintivo, siendo dichas células, células que inducen tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante, para su uso como un tratamiento adyuvante para la erradicación de una enfermedad en un sujeto que ha sido trasplantado con un injerto de célula o de tejido no singénico, en el que dichas células son:

- (i) no singénicas con el sujeto y dicho injerto o
- (ii) no singénicas con dicho injerto y singénicas con el sujeto.

Preferiblemente, dicha célula o tejido de injerto es no autólogo y dicha población de células aislada son autólogas.

Preferiblemente, dicha célula o tejido del injerto y dicha población de células aislada son de diferentes donantes.

Preferiblemente, dicha enfermedad comprende una neoplasia maligna y opcionalmente, una neoplasia maligna de linfocitos B.

Preferiblemente, dicho injerto comprende células de médula ósea y opcionalmente células hematopoyéticas inmaduras.

Preferiblemente, cuando dichas células hematopoyéticas inmaduras son no singénicas con el sujeto, dicha población de células aislada son singénicas con el sujeto.

Preferiblemente, dichas células hematopoyéticas inmaduras son no autólogas y dicha población de células aislada son autólogas.

Preferiblemente, cuando dichas células hematopoyéticas inmaduras son no singénicas con el sujeto, dicha población de células aislada son no singénicas con el sujeto y con dicho injerto.

Preferiblemente dichas células hematopoyéticas inmaduras y dicha población de células aislada son de diferentes donantes.

Preferiblemente, dichos ganglios linfáticos comprenden los ganglios linfáticos periféricos o los ganglios linfáticos mesentéricos.

Preferiblemente, dichas células no singénicas con dicho injerto y singénicas con el sujeto comprenden células autólogas.

La presente invención se refiere también a una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), comprendiendo dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) el distintivo CD8⁺/CD62L⁺/CD45RO⁺ y en el que al menos el 50 % de la población de células aislada tienen dicho distintivo, siendo dichas células, células que inducen tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante, para su uso como un tratamiento adyuvante para la erradicación de una enfermedad en un sujeto que ha sido trasplantado con células hematopoyéticas inmaduras y en el que además cuando dichas células hematopoyéticas inmaduras son singénicas con el sujeto, dicha población de células aislada se selecciona para que sea singénica con el sujeto o no singénica con el sujeto.

Preferiblemente dichas células hematopoyéticas inmaduras y dicha población de células aislada son autólogas o dichas células hematopoyéticas inmaduras son autólogas y dicha población de células aislada son no autólogas.

Preferiblemente dichas células anti-terceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo dichas células, células que inducen tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante son generadas:

- (a) poniendo en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21 en condiciones que permiten la eliminación de las células reactivas GVH y
- (b) cultivando dichas células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-15 en un entorno libre de antígeno en condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), generando de ese modo la población de células aislada.

Preferiblemente dichas condiciones que permiten la eliminación de las células reactivas GVH comprenden el cultivo durante 1-5 días.

Preferiblemente, dicho cultivo en presencia de IL-15 se efectúa durante 3-30 días.

Preferiblemente, dichas condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), comprenden además IL-7 y/o IL-21. Preferiblemente, dicha enfermedad comprende leucemia o linfoma.

5 Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria a manera de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos acompañantes. Con referencia específica ahora a los dibujos con detalle, se destaca que los detalles mostrados son a manera de ejemplo y para propósitos de la discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención. En este aspecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a aquellas personas expertas en la técnica cómo se pueden llevar a cabo las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

15 Las Figuras 1A-I representan la inhibición de la recidiva tumoral por linfocitos Tcm anti-terceros derivados singénicos después del trasplante de médula ósea singénico. Ratones BALB/c (H-2^d) letalmente irradiados (8 Gy) recibieron intravenosamente un trasplante de 3×10^6 células de médula ósea agotadas de linfocitos T singénicas (BALB/c-NUDE (H-2^d) en presencia o ausencia de 5×10^3 células de linfoma A20-luc (día 0). Los ratones se inyectaron después intravenosamente con o sin los números indicados de linfocitos Tcm anti-terceros derivados BALB/c (indicados como células de leucemia + Tcm, n = 7; o con solamente células de leucemia, n = 7, respectivamente) en el día +1. Las Figuras 1A-H son fotografías que representan el crecimiento tumoral monitorizado mediante imágenes de bioluminiscencia (BLI) desde el día 14 en intervalos semanales; la Figura 1I es una gráfica que representa la tasa de supervivencia de los animales de los diferentes grupos de tratamiento. El eje X indica los días después de la inyección de células tumorales y el eje Y indica el porcentaje de supervivencia de los ratones receptores.

25 Las Figuras 2A-G representan la inhibición de la recidiva tumoral por linfocitos T CD8 anti-terceros derivados de F1 después del trasplante de médula ósea singénico. Ratones BALB/c (H-2^d) letalmente irradiados (8 Gy) recibieron intravenosamente un trasplante de 3×10^6 células de médula ósea agotadas de linfocitos T singénicas (BALB/c-NUDE (H-2^d) en presencia o ausencia de 5×10^3 células de linfoma A20-luc (día 0). Los ratones se inyectaron después intravenosamente con o sin 2×10^7 linfocitos Tcm anti-terceros derivados de F1 (células de leucemia + Tcm, n = 7) o sin (células de leucemia solas, n=5) en el día +1; las Figuras 2A-F son fotografías que representan el crecimiento tumoral monitorizado por BLI desde el día 14 en intervalos semanas. La Figura 2G es una gráfica que representa la tasa de supervivencia de los animales de los diferentes grupos de tratamiento. El eje X indica los días después de la inyección de linfocitos tumorales y el eje Y indica el porcentaje de supervivencia de los ratones receptores.

35 Las Figuras 3A-I representan la inhibición de la recidiva tumoral por linfocitos Tcm anti-terceros derivados alogénicos después del trasplante de médula ósea alogénico. Ratones BALB/c (H-2^d) letalmente irradiados (8 Gy) recibieron intravenosamente un trasplante de 3×10^6 células de médula ósea agotadas de linfocitos T alogénicos (C57BL/6-NUDE (H-2^b) en presencia o ausencia de 5×10^3 células de linfoma A20-luc (día 0). Los ratones se inyectaron después intravenosamente con células derivadas C57BL/6 (en el día +1). Las Figuras 3A-H son fotografías que representan el crecimiento tumoral monitorizado por BLI desde el día 13 en intervalos semanales; la Figura 3I es una gráfica que representa la tasa de supervivencia de los animales de los diferentes grupos de tratamiento. El eje X indica días después de la inyección de linfocitos tumorales y el eje Y indica el porcentaje de supervivencia de los ratones receptores.

45 Las Figuras 4A-B son gráficas que representan la proliferación y fenotipo celular de linfocitos T de memoria central anti-terceros de la presente invención. La Figura 4A representa la proliferación de linfocitos Tcm desde el día 0 hasta el día 12 del cultivo y la Figura 4B representa el fenotipo celular usando el mismo cultivo contra Alo-DC.

La Figura 5 es una gráfica que representa el porcentaje de células apoptóticas después de 22 horas de reacción de linfocitos mezclados (MLR) con líneas de células de linfoma de linfocitos B y de leucemia de células plasmáticas. Líneas de células Daudi pre-etiquetadas con CalceinAM, mutante H.My2 C1R HLA A2 K66A o L363 se incubaron durante 22 horas con o sin exceso de 5 veces de Tcm anti-terceros. Las células anexina V+ se determinaron por FACS. Los datos se muestran como media $\pm$ DE de cultivos pentaplicados. Los valores ***p<0,001 indican cambios estadísticamente significativos comparados con las muestras cultivadas en la ausencia de Tcm.

50 La Figura 6 es una gráfica que representa el número de células vivas después 22 horas de la reacción de linfocitos mezclados (MLR) con líneas de células EBV-LCL de linfoma de linfocitos B y de leucemia de células plasmáticas. Líneas de células Daudi pre-etiquetadas con CalceinAM, mutante H.My2 C1R HLA A2 K66A o L363 se incubaron durante 22 horas con o sin exceso de 5 veces de Tcm anti-terceros. Los números de células CalceinAM+ viables se determinaron por FACS. Los datos se muestran como media $\pm$ DE de cultivos pentaplicados. Los valores ***p<0,001 indican cambios estadísticamente significativos comparados con las muestras cultivadas en la ausencia de Tcm.

60 Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente divulgación, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que comprenden un fenotipo de linfocito T de memoria central y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de las mismas para el tratamiento de injerto contra leucemia/linfoma.

Los principios y operación de la presente invención se pueden entender mejor con referencia a los dibujos y descripciones acompañantes.

Antes de explicar por lo menos una realización de la invención con detalle, ha de entenderse que la invención no se limita necesariamente en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención contempla otras realizaciones o puede ser puesta en práctica o ser llevada a cabo en varias formas. También, se va a entender que la fraseología y terminología empleadas en la presente memoria es para el propósito de la descripción y no se deben considerar como limitantes.

Al llevar la presente invención a la práctica, los presentes inventores han descubierto que los linfocitos T de memoria central (Tcm) CD8+ anti-terceros comprenden actividad de injerto contra leucemia/linfoma (GVL) *in vivo* y, por lo tanto, se pueden usar para tratar enfermedades hematopoyéticas malignas, tales como linfoma y leucemia.

Como se muestra en la presente memoria a continuación y en la sección de Ejemplos que sigue, los presentes inventores han mostrado la reactividad GVL de linfocitos Tcm CD8+ anti-terceros en un modelo de ratón *in vivo* diseñado específicamente para estimular el trasplante de médula ósea alogénico (BMT) en pacientes con linfoma. Inicialmente, los inventores confirmaron *in vitro* que los linfocitos Tcm anti-terceros murinos derivadas no alorreactivos actúan de forma similar a los CTL anti-terceros humanos y erradican directamente las células de linfoma murino A20 (ver el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos que sigue). Posteriormente, los presentes inventores establecieron un modelo de ratón de enfermedad residual mínima para linfoma de linfocitos B usando la línea de células de linfoma de linfocitos B A20 en las cuales el gen informador de luciferasa estaba integrado establemente en su genoma (A20-luc). Estas células permitían la monitorización sensible de la progresión del tumor *in vivo* mediante formación de imágenes de bioluminiscencia (BLI). Usando este modelo, los inventores descubrieron que tanto los linfocitos Tcm anti-terceros singénicos como alogénicos mostraban una reactividad GVL marcada sin provocar enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) cuando se administraban junto con un trasplante de médula ósea singénico (Ejemplos 2 y 3, respectivamente, de la sección de Ejemplos que sigue). Adicionalmente, los presentes inventores mostraron un efecto GVL efectivo carente de GVHD cuando se administran linfocitos Tcm anti-terceros alogénicos (tipo donante) junto con un trasplante de médula ósea alogénico (Ejemplo 4, de la sección de Ejemplos que sigue). En conjunto, todos estos descubrimientos justifican el uso de linfocitos Tcm anti-terceros como células de injerto contra leucemia/linfoma para la erradicación de células enfermas. Por otra parte, los presentes resultados muestran la capacidad de usar linfocitos Tcm anti-terceros de un donante no singénico con respecto al receptor y al donante de trasplante (por ejemplo, de dos donantes diferentes).

De esta manera, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para tratar una enfermedad en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método: (a) trasplantar un injerto de célula o de tejido al sujeto y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células inductoras de tolerancia incapaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante y en el que además las células son: (i) no singénicas tanto con el sujeto como con el injerto; o (ii) no singénicas con el injerto y singénicas con el sujeto, para de esta manera tratar al sujeto.

Como se usa en la presente memoria, el término “tratar” incluye anular, inhibir sustancialmente, desacelerar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” o “sujeto en necesidad del mismo” se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano, hombre o mujer de cualquier edad que esté en necesidad de un injerto de célula o de tejido. Generalmente, el sujeto está en necesidad de un injerto de célula o de tejido (también referido en la presente memoria como receptor, debido a un trastorno o una afección, estado o síndrome patológico o indeseado, o a una anomalía física, morfológica o fisiológica que es susceptible de tratamiento a través del trasplante de un injerto de célula o de tejido. Ejemplos de tales trastornos se proporcionan a continuación adicionalmente.

Como se usa en la presente memoria, la frase “injerto de célula o de tejido” se refiere a una célula corporal (por ejemplo una sola célula o un grupo de células) o tejido (por ejemplo tejidos sólidos o tejidos blandos que se pueden trasplantar en totalidad o en parte). Ejemplos de tejidos que se pueden trasplantar de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, tejidos linfoides/hematopoyéticos (por ejemplo, ganglio linfático, parches de Peyer, timo o médula ósea). Ejemplos de células que se pueden trasplantar de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, células madre hematopoyéticas (por ejemplo células hematopoyéticas inmaduras).

De acuerdo con una realización específica, las células madre hematopoyéticas de la presente invención son CD34+.

Dependiendo de la aplicación, el método se puede llevar a cabo usando un injerto de célula o de tejido que es singénico o no singénico con el sujeto.

Como se usa en la presente memoria, el término “singénico” se refiere a una célula o tejido que se deriva de un individuo que es esencialmente genéticamente idéntico con el sujeto. Generalmente, los mamíferos completamente endogámicos, los clones de mamífero o los mamíferos gemelos homocigóticos son singénicos.

- 5 Ejemplos de células o tejidos singénicos incluyen células o tejidos derivados del sujeto (también referidos en la técnica como “autólogos”), un clon del sujeto, o un gemelo homocigótico del sujeto.

10 Como se usa en la presente memoria, el término “no singénico” se refiere a una célula o tejido que se deriva de un individuo que es alogénico xenogénico con los linfocitos del sujeto (también referido en la técnica como “no autólogos”).

15 Como se usa en la presente memoria, el término “alogénico” se refiere a una célula o tejido que se deriva de un donante que es de la misma especie que el sujeto, pero que es sustancialmente no clonal con el sujeto. Generalmente, los mamíferos gemelos no zigóticos, exogámicos de la misma especie son alogénicos entre sí. Se apreciará que un donante alogénico puede ser HLA idéntico o HLA no idéntico con respecto al sujeto.

20 Como se usa en la presente memoria, el término “xenogénico” se refiere a una célula o tejido que expresa sustancialmente antígenos de una especie diferente respecto a las especies de una proporción sustancial de los linfocitos del sujeto. Generalmente, mamíferos exogámicos de diferentes especies son xenogénicos entre sí.

25 La presente divulgación contempla que las células o tejidos xenogénicos se derivan de una variedad de especies tales como, pero sin limitarse a, bovinos (por ejemplo, vacas), équidos (por ejemplo, caballos), porcinos (por ejemplo cerdos), óvidos (por ejemplo, cabra, oveja), felinos (por ejemplo, Felis domestica), caninos (por ejemplo, Canis domestica), roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo, conejillo de Indias jerbo, hámster) o primates (por ejemplo, chimpancé, mono Rhesus, mono macaco, mono tití).

30 Las células o tejidos de origen xenogénico (por ejemplo origen porcino) se obtienen preferiblemente de una fuente que es conocida por estar libre de zoonosis, tal como retrovirus endógenos porcinos. De modo similar, las células o tejidos derivados de humano se obtienen preferiblemente de fuentes sustancialmente sin patógenos.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, tanto el sujeto como el donante son humanos.

35 Dependiendo de la aplicación y de las fuentes disponibles, los injertos de células o de tejido de la presente invención se pueden obtener de un organismo prenatal, organismo postnatal, un adulto o un donante cadáver. Por otra parte, dependiendo de la aplicación necesaria, las células o tejidos pueden ser indiferenciados o genéticamente modificados. Tales determinaciones están perfectamente dentro de la capacidad de una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

40 Cualquier método conocido en la técnica se puede emplear para tener una célula o tejido (por ejemplo, para trasplantes).

45 El trasplante del injerto de célula o tejido en el sujeto se puede efectuar en varias formas, dependiendo de varios parámetros, tales como, por ejemplo, el tipo de célula o tejido; el tipo, etapa o gravedad de la enfermedad del receptor (por ejemplo insuficiencia orgánica); los parámetros físicos o fisiológicos específicos del sujeto y/o el resultado terapéutico deseado.

50 El trasplante de un injerto de célula o de tejido de la presente divulgación se puede efectuar trasplantando el injerto de célula o de tejido en cualquiera de varias ubicaciones anatómicas, dependiendo de la aplicación. El injerto de célula o de tejido se puede trasplantar en una ubicación anatómica homotópica (una ubicación anatómica normal para el trasplante) o en una ubicación anatómica ectópica (una ubicación anatómica anormal para el trasplante). Dependiendo de la aplicación, el injerto de célula o de tejido se puede implantar ventajosamente bajo la cápsula renal, o en el riñón, la grasa testicular, el tejido subcutáneo, el omento, la vena porta, el hígado, el bazo, los huesos, la cavidad cardíaca, el corazón, la cavidad torácica, el pulmón, la piel, el páncreas y/o el espacio intra-abdominal.

55 Por ejemplo, en los casos que requieran trasplante de células hematopoyéticas inmaduras, las células hematopoyéticas autólogas, alogénicas o xenogénicas inmaduras (por ejemplo, células madre) que se pueden derivar, por ejemplo, de médula ósea, sangre periférica movilizada (mediante por ejemplo leucaferesis), hígado fetal, saco vitelino y/o sangre del cordón umbilical del donante singénico o no singénico se pueden trasplantar a un receptor que padece una enfermedad.

60 De acuerdo con una realización de la presente divulgación, la enfermedad es una enfermedad maligna. De acuerdo con una realización específica, la enfermedad maligna es una neoplasia maligna de tejidos hematopoyéticos o linfoides. De acuerdo con otra realización específica, la enfermedad maligna es una neoplasia maligna de linfocitos B (es decir, que implica a los linfocitos B).

65 Tal enfermedad incluye, pero no se limita a, leucemia [por ejemplo, linfática aguda, linfoblástica aguda, linfoblástica aguda de linfocitos pre-B, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, megacarioblástica aguda, monocítica,

mielogénica aguda, mieloide aguda, mieloide aguda con eosinofilia, de linfocitos B, basofílica, mieloide crónica, crónica, eosinofílica, de Friend, granulocítica o mielocítica, de células pilosas, linfocítica, megacarioblástica, monocítica, monocítica-macrófago, mieloblástica, mieloide, mielomonocítica, de células plasmáticas, de linfocitos pre-B, promielocítica, subaguda, de linfocitos T, neoplasma linfoide, predisposición a neoplasia maligna mieloide, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (T-ALL) y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL)], linfoma [por ejemplo, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfocitos B, linfoma de linfocitos B grandes difusos (DLBCL), leucemia/linfoma linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma de Burkitt, de linfocitos T, linfocitos T cutáneos, leucemia/linfoma de linfocitos T precursores, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma MALT, histiocítica, linfoblástica, tímica y Mycosis fungoides], enfermedades asociadas con trasplante de un injerto (por ejemplo rechazo de injerto, rechazo de injerto crónico, rechazo de injerto sub-agudo, rechazo de injerto hiperagudo, rechazo de injerto agudo y enfermedad de injerto contra hospedador), enfermedades autoinmunitarias, tales como diabetes tipo 1, síndromes de inmunodeficiencia combinada graves (SCID), que incluyen adenosina desaminasa (ADA), osteoporosis, anemia aplásica, enfermedad de Gaucher, talasemia y otras anomalías hematopoyéticas congénitas o genéticamente determinadas.

Se apreciará que las células hematopoyéticas singénicas o no singénicas (por ejemplo células hematopoyéticas inmaduras) de la presente divulgación se pueden trasplantar en un receptor usando cualquier método conocido en la técnica para el trasplante de células, tal como pero sin limitarse a, infusión de células (por ejemplo I.V.) o a través de una vía intraperitoneal.

Opcionalmente, cuando se trasplanta injerto de célula o de tejido de la presente divulgación en un sujeto que tiene un órgano defectuoso, puede ser ventajoso primero eliminar por lo menos parcialmente el órgano afectado del sujeto para permitir el desarrollo óptimo del injerto y la integración estructural/funcional del mismo con la anatomía/fisiología del sujeto.

Después del trasplante del injerto de célula o de tejido en el sujeto de acuerdo con las presentes enseñanzas, es aconsejable, de acuerdo con la práctica médica estándar, controlar el desarrollo de la funcionalidad y de la inmunocompatibilidad del órgano de acuerdo con una de las diversas técnicas estándar. Por ejemplo, el desarrollo estructural de las células o tejidos se puede controlar mediante la obtención de imágenes de tomografía computarizada o ecográficas mientras que la incorporación del injerto de la célula no singénica o los injertos de médula ósea se pueden controlar por ejemplo mediante una prueba de quimerismo [por ejemplo, mediante procedimientos basados en PCR usando el análisis de repetición en tándem corto (STR)].

Independientemente del tipo de trasplante, para evitar el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra hospedador y para eliminar cualquier célula tumoral residual, el método de la presente divulgación usa linfocitos Tcm anti-terceros.

De esta manera, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, al sujeto se le administra una cantidad terapéuticamente efectiva de una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células, células que inducen tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante.

La frase “población de células aislada” como se usa en la presente memoria se refiere a células que se han aislado de su medio ambiente natural (por ejemplo, el cuerpo humano).

El término “no induce GVHD” como se usa en la presente memoria se refiere a no tener sustancialmente reactividad inductora de injerto contra hospedador. De esta manera, las células de la presente divulgación se generan de forma que no provoquen significativamente enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD).

La frase “células anti-terceros” como se usa en la presente memoria se refiere a linfocitos (por ejemplo linfocitos T) que se dirigen (por ejemplo mediante reconocimiento de linfocitos T) contra un antígeno o antígenos de terceros.

Como se usa en la presente memoria, la frase “antígeno o antígenos de terceros” se refiere a un antígeno o antígenos solubles o no solubles (tal como los asociados a la membrana) que no están presentes ni en el donante ni en el receptor, como se representa con detalle a continuación.

De acuerdo con una realización, el antígeno o antígenos de terceros de la presente divulgación se seleccionan del grupo que consiste en células de terceros, un antígeno celular, un antígeno viral un antígeno bacteriano, un extracto de proteína, una proteína purificada y un péptido sintético presentado por células presentadoras autólogas, células presentadoras no autólogas o sobre una célula presentadora de vehículo artificial o de antígeno artificial.

Por ejemplo, los antígenos de terceros pueden ser células de terceros, antígenos de virus, tales como por ejemplo del virus de Epstein-Barr (EBV) o citomegalovirus (CMV) o antígenos de bacterias, tal como flagelina. Los antígenos virales o bacterianos se pueden presentar por células (por ejemplo, línea de células) infectadas con los mismos o de otra manera fabricados para expresar proteínas virales/bacterianas. Las células presentadoras de antígenos

autólogas o no autólogas se pueden usar para presentar péptidos sintéticos cortos fusionados o cargados en los mismos. Tales péptidos cortos pueden ser péptidos derivados virales o péptidos que representan cualquier otro antígeno.

- 5 Se puede usar software especializado para analizar secuencias virales u otras para identificar péptidos cortos inmunogénicos, es decir, péptidos presentables en el contexto del MHC clase I o MHC clase II.

10 Las células de terceros pueden ser alogénicas o xenogénicas con respecto al receptor (explicado con mayor detalle posteriormente). En el caso de las células de terceros alogénicas, tales células tienen antígenos HLA diferentes de aquellos del donante pero que no sufren reacción cruzada con los antígenos HLA del receptor, de tal manera que las células anti-terceros generadas contra tales células no son reactivas contra un trasplante o los antígenos del receptor.

15 De acuerdo con una realización de la presente divulgación, las células de terceros alogénicas o xenogénicas son células estimuladoras tales como, pero sin limitarse a, células purificadas de linfocitos de sangre periférica (PBL), bazo o ganglios linfáticos, PBL movilizadas con citocina, células dendríticas presentadoras de antígeno (APC) expandidas *in vitro*, líneas de linfocitos B, células presentadoras de antígeno (APC) tales como APC artificiales (por ejemplo línea de células K562 transfectadas con HLA y/o moléculas co-estimuladoras).

20 De acuerdo con una realización, el antígeno o antígeno de terceros comprenden células dendríticas.

25 Los antígenos de terceros se pueden presentar sobre las superficies celulares, virales o bacterianas o derivadas y/o purificadas de las mismas. Adicionalmente, un antígeno viral, bacteriano o cualquier antígeno extraño se puede expresar en una célula infectada o se puede expresar sobre un vehículo artificial tal como un liposoma o una APC artificial (por fibroblasto o línea de células leucémicas transfectadas con el antígeno o antígeno de terceros).

30 Además, los antígenos de terceros pueden, por ejemplo, ser proteínas extraídas o purificadas a partir de una variedad de fuentes. Un ejemplo de una proteína purificada que puede servir como un antígeno de terceros de acuerdo con la presente invención es la ovalbúmina. Se contemplan otros ejemplos.

35 El uso de células, virus, bacterias, células presentadoras viralmente infectadas, infectadas con bacterias, de péptidos virales o de péptidos bacterianos como antígenos de terceros es particularmente ventajoso puesto que tales antígenos de terceros incluyen una disposición diversa de determinantes antigénicos y como tal dirigen la formación de células anti-terceros de una población diversa, que puede servir adicionalmente en la rápida constitución de linfocitos T en casos donde tal reconstitución es requerida, por ejemplo, después del procedimiento de irradiación letal o sub-letal o quimioterapia.

40 Adicionalmente, cuando las células anti-terceros se dirigen contra antígenos de terceros, es ventajoso obtener por lo menos alguna actividad de injerto contra enfermedad (por ejemplo, células cancerosas tal como injerto contra leucemia) debido a una destrucción independiente de TCR mediada por el enlace LFA1-ICAM1 [Arditti y colaboradores, Blood (2005) 105(8):3365-71. Epub 2004 Jul 6].

45 De acuerdo con algunas realizaciones, las células anti-terceros de la presente divulgación comprenden un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm).

50 La frase "fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm)" como se usa en la presente memoria se refiere a un subconjunto de linfocitos T citotóxicos que se alojan en los ganglios linfáticos. Las células que tienen el fenotipo Tcm, en humanos, expresan generalmente CD8+/CD62L+/CD45R0+/L- selectina+/CD45RA-. De acuerdo con una realización más específica el fenotipo Tcm comprende un distintivo CD8+/CD62L+. Se apreciará que los linfocitos Tcm pueden expresar todos los marcadores de distintivo en una sola célula o pueden expresar solamente parte de los marcadores de distintivo en una sola célula.

55 Se apreciará que por lo menos 30 %, por lo menos 40 %, por lo menos 50 %, por lo menos 55 %, por lo menos 60 %, por lo menos 65 %, por lo menos 70 %, por lo menos 75 %, por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o por lo menos 100 % de la población de células aislada comprenden células que tienen el distintivo de células.

60 Como se menciona, los linfocitos Tcm se alojan generalmente en los ganglios linfáticos después del trasplante. De acuerdo con algunas realizaciones, los linfocitos Tcm anti-terceros de la presente divulgación pueden alojarse en cualquiera de los ganglios linfáticos después del trasplante, como por ejemplo, en los ganglios linfáticos periféricos y en los ganglios linfáticos mesentéricos. La naturaleza migratoria de estas células les permite ejercer su efecto de tolerancia de una manera rápida y eficiente.

65 De esta manera, los linfocitos Tcm anti-terceros de la presente divulgación son células inductoras de tolerancia.

La frase "células inductoras de tolerancia" como se usa en la presente memoria se refiere a células que provocan una respuesta disminuida de las células del receptor (por ejemplo linfocitos T del receptor) cuando entran en contacto con las mismas. Las células inductoras de tolerancia incluyen células veto (es decir linfocitos T que conducen a la apoptosis de los linfocitos T del hospedador en el contacto con las mismas) como se ha descrito previamente en las publicaciones PCT Números WO 2001/049243 y WO 2002/102971.

El uso de células inductoras de tolerancia es especialmente beneficioso en situaciones en las cuales existe una necesidad de eliminar el rechazo del injerto y superar la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), tal como en el trasplante de células o tejidos alogénicos o xenogénicos.

De acuerdo con algunas realizaciones, los linfocitos Tcm de la presente divulgación pueden ser células indiferenciadas (por ejemplo no genéticamente modificadas) o células genéticamente modificadas (por ejemplo células que se han diseñado genéticamente para expresar o no expresar genes específicos, marcadores o péptidos o para secretar o no secretar citocinas específicas). Cualquier método conocido en la técnica se puede implementar a la hora de modificar genéticamente las células, tal como mediante inactivación del gen/genes relevantes o mediante la inserción de un ARN antisentido que interfiere con la expresión del polipéptido (ver por ejemplo WO/2000/039294).

Cualquier método usado para la generación de células no alorreactivas anti-terceros (carentes de actividad de injerto contra hospedador (GVH)) se puede usar de acuerdo con las presentes enseñanzas.

Los linfocitos Tcm anti-terceros de la presente divulgación se generan generalmente primero poniendo en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) singénicas o no singénicas con un antígeno o antígenos de terceros (tal como se describe en lo anterior) en un cultivo privado de citocinas (es decir, sin la adición de citocinas). Esta etapa se lleva a cabo generalmente durante aproximadamente 12-72 horas, 24-48 horas, 1-10 días, 1-7 días, 1-5 días, 2-3 días o 2 días y permite la eliminación de células reactivas GVH (por ejemplo linfocitos T). En otra alternativa, los linfocitos Tcm anti-terceros se pueden generar carentes de actividad de injerto contra hospedador (GVH) al complementar el cultivo de otra manera sin citocinas con IL-21 (0,001-3000 ng/ml, 10-1000 ng/ml, 10-100 ng/ml, 1-100 ng/ml, 0,1-100 ng/ml, 0,1-10 ng/ml, 1-50 ng/ml o 1-10 ng/ml). Esta etapa se lleva a cabo generalmente durante aproximadamente 12-72 horas, 24-48 horas, 1-10 días, 1-7 días, 1-5 días, 2-3 días o 3 días.

Después, las células anti-terceros se cultivan en presencia de IL-15 (0,05-500 ng/ml, 0,001-3000 ng/ml, 10-1000 ng/ml, 10-100 ng/ml, 1-100 ng/ml, 0,1-100 ng/ml, 0,1-10 ng/ml, 1-50 ng/ml o 1-10 ng/ml). De acuerdo con una realización específica, la concentración es 5 ng/ml) durante un período de aproximadamente 3-30 días, 6-30 días, 3-20 días, 10-20 días, 3-15 días, 5-15 días, 7-15 días, 7-14 días, 3-10 días, 3-7 días o 14 días en un entorno sin antígeno. El cultivo se puede llevar a cabo adicionalmente en presencia de citocinas adicionales tales como IL-7 (0,05-500 ng/ml, 0,001-3000 ng/ml, 10-1000 ng/ml, 10-100 ng/ml, 1-100 ng/ml, 0,1-100 ng/ml, 0,1-10 ng/ml, 1-50 ng/ml o 1-10 ng/ml). De acuerdo con una realización específica la concentración es 5 ng/ml) y/o IL-21 (0,001-3000 ng/ml, 0,001-3000 ng/ml, 10-1000 ng/ml, 10-100 ng/ml, 1-100 ng/ml, 0,1-100 ng/ml, 0,1-10 ng/ml, 1-50 ng/ml o 20-50 ng/ml). De acuerdo con una realización específica la concentración es 30 ng/ml). Este proceso permite la proliferación de células anti-terceros que comprenden un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) y que carecen de reactividad GVHD.

Se apreciará que se puede llevar a cabo una etapa adicional que permita la selección de linfocitos T CD8+, tal como mediante el uso de cuentas de MACS, antes del cultivo de las células en presencia de IL-15. Tal etapa puede ser beneficiosa con el fin de incrementar la pureza de las células CD8+ dentro del cultivo (es decir eliminar otros linfocitos dentro del cultivo celular, por ejemplo, linfocitos T CD4+) o con el fin de incrementar el número de linfocitos T CD8+. De esta manera, el aislamiento de las células CD8+ se puede hacer antes del cultivo con el antígeno o antígenos de terceros o después del cultivo con el antígeno o antígenos de terceros y antes del cultivo con CD15.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las PBMC singénicas (por ejemplo del sujeto) se pueden usar de acuerdo con las presentes enseñanzas (es decir en situaciones donde los linfocitos Tcm singénicos pueden ser beneficiosos para el tratamiento). Del mismo modo, las PBMC no singénicas (por ejemplo alogénicas o xenogénicas con respecto al sujeto) se pueden usar de acuerdo con las presentes enseñanzas. La fuente de las PBMC se determinará con respecto al uso previsto de las células (ver detalles adicionales) posteriormente en la presente) y estarán dentro de la capacidad de una persona experta en la técnica, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en la presente memoria.

Como se describe con detalle en la sección de Ejemplos que sigue, los presentes inventores han mostrado que los linfocitos Tcm anti-terceros pueden tener el mismo origen que el injerto de célula o de tejido (por ejemplo células de la médula ósea), específicamente, se pueden derivar tanto de un donante singénico (por ejemplo del sujeto, ver Ejemplo 2 y Figuras 1A-I) o ambos se pueden derivar de un donante no singénico (por ejemplo de un donante alogénico, ver el Ejemplo 4 y Figuras 3A-I). A la inversa, los linfocitos Tcm anti-terceros pueden provenir de un origen diferente comparado con el injerto de célula o de tejido (por ejemplo las células de médula ósea pueden provenir del sujeto y las células anti-terceros pueden provenir de un donante alogénico, Ejemplo 3 y Figuras 2A-G).

De esta manera, de acuerdo con una realización de la presente divulgación, los linfocitos Tcm anti-terceros pueden ser no singénicos (por ejemplo alogénicos o xenogénicos) tanto con el sujeto como con el injerto.

Como se usa en la presente memoria, la frase "no singénico tanto con el sujeto como con el injerto" en relación con los linfocitos Tcm anti-terceros de la presente divulgación califica los linfocitos Tcm anti-terceros como alogénicos o xenogénicos con el sujeto y alogénicos o xenogénicos con el injerto en cualquier combinación. De esta manera, los linfocitos Tcm anti-terceros se pueden obtener de un origen diferente del sujeto y del donante del injerto.

De acuerdo con una realización específica, los linfocitos Tcm anti-terceros son no singénicos tanto con el sujeto como con el injerto (por ejemplo de un segundo donante).

De acuerdo con otra realización, los linfocitos Tcm anti-terceros pueden ser no singénicos con respecto a solo el sujeto. De acuerdo con otra realización, los linfocitos Tcm anti-terceros pueden ser no singénicos con respecto a solo el injerto de célula o de tejido.

De acuerdo con una realización, los linfocitos Tcm anti-terceros son no singénicos con el injerto y singénicos con el sujeto (por ejemplo de un origen autólogo en situaciones en las cuales el injerto es de un origen no autólogo).

De acuerdo con una realización específica, cuando el injerto comprende células hematopoyéticas inmaduras que no son singénicas con el sujeto (por ejemplo no autólogas), la población de células aislada son singénicas con el sujeto (por ejemplo autólogas).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "células hematopoyéticas inmaduras" se refiere a cualquier tipo de células incompletamente diferenciadas que son capaces de diferenciarse en uno o más tipos de células hematopoyéticas completamente diferenciadas. Las células hematopoyéticas inmaduras incluyen sin limitación tipos de células referidas en la técnica como "células progenitoras", "células precursoras", "células madre", "células pluripotentes", "células multipotentes" y similares.

Preferiblemente las células hematopoyéticas inmaduras son células madre hematopoyéticas.

Preferiblemente, cuando las células hematopoyéticas inmaduras se derivan de un humano, las células hematopoyéticas inmaduras son células CD34+, tales como células CD34+CD133+.

Tipos de injertos de la presente divulgación que comprenden células hematopoyéticas inmaduras incluyen injertos de células de médula ósea completas (agotadas de linfocitos T o no agotadas de linfocitos T), injertos de células hematopoyéticas inmaduras de aspirados de médula ósea, injertos de células hematopoyéticas inmaduras de sangre periférica e injertos de células hematopoyéticas inmaduras derivadas del cordón umbilical. Se describen posteriormente en la presente métodos para obtener tales injertos.

Un injerto que comprende células madre hematopoyéticas derivadas de sangre periférica humanas se puede obtener de acuerdo con métodos estándar, por ejemplo movilizándolo células CD34+ en la sangre periférica mediante el tratamiento con citocinas del donante y recolectando las células CD34+ movilizadas mediante leucaferesis. Se proporciona una orientación amplia en la literatura de la técnica para practicar el aislamiento de células madre derivadas de médula ósea de la médula ósea o la sangre (véase, por ejemplo Arai S, Klingemann HG., 2003. 10 Arch Med Res. 34:545-53; y Repka T. y Weisdorf D., 1998. Curr Opin Oncol. 10:112-7; Janssen WE. y colaboradores, 1994. Cancer Control 1:225-230; Atkinson K., 1999. Curr Top Pathol. 92:107-36).

Un injerto de células madre hematopoyéticas derivadas de cordón umbilical humano se puede obtener de acuerdo con métodos estándar (véase, por ejemplo Quillen K, Berkman EM., 1996. J Hematother. 5:153-5).

Un injerto de células madre hematopoyéticas de la presente divulgación también se puede derivar de tejido del hígado o saco vitelino.

Un número requerido de células madre hematopoyéticas se puede proporcionar mediante la expansión *ex vivo* de células madre hematopoyéticas primarias (revisado en Emerson, 1996, Blood 87:3082, y descrito con más detalle por Petzer y colaboradores, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 3:1470; Zundstra y colaboradores, 1994, BioTechnology 12:909 y el documento WO 95 11692). De acuerdo con otra realización específica, cuando el injerto comprende células hematopoyéticas inmaduras que no son singénicas con el sujeto (por ejemplo no autólogas), la población de células aislada no son singénicas tanto con el sujeto como con el injerto. (Por ejemplo las células hematopoyéticas inmaduras y la población de células aislada son de diferentes donantes).

De acuerdo con otra realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método: (a) trasplantar células hematopoyéticas inmaduras al sujeto y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células, células inductoras de tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante, en el que cuando las células hematopoyéticas inmaduras son singénicas con el

sujeto, la población de células aislada se selecciona de forma que sean singénicas con el sujeto o no singénicas con el sujeto.

5 De acuerdo con una realización específica, tanto las células hematopoyéticas inmaduras como la población aislada de células son autólogas (por ejemplo del sujeto).

De acuerdo con otra realización específica, las células hematopoyéticas inmaduras son autólogas (por ejemplo del sujeto) y la población de células aislada no son autólogas (por ejemplo de un donante).

10 De acuerdo con otra realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método: (a) trasplantar células hematopoyéticas inmaduras al sujeto y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células, células inductoras de tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante, en el que cuando las células hematopoyéticas inmaduras no son singénicas con el
15 sujeto, la población de células aislada se selecciona de forma que sean singénicas con el sujeto o no singénicas ni con el sujeto ni con las células hematopoyéticas inmaduras.

20 De acuerdo con una realización específica, las células hematopoyéticas inmaduras no son autólogas (por ejemplo de un donante) y la población de células aislada son autólogas (por ejemplo del sujeto).

De acuerdo con otra realización, cuando las células hematopoyéticas inmaduras no son singénicas con el sujeto (por ejemplo no autólogas), los linfocitos Tcm anti-terceros no son singénicos ni con el sujeto ni con el injerto (por ejemplo dos donantes diferentes).

25 De acuerdo con una realización específica, las células hematopoyéticas inmaduras y la población de células aislada son de diferentes donantes.

30 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células, células inductoras de tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante y en el que adicionalmente las células no son singénicas ni con un sujeto ni con un injerto de célula o de tejido.

35 (i) no singénicas ni con un sujeto hospedador ni con un injerto; o
(ii) no singénicas con un injerto y singénicas con un sujeto hospedador.

De acuerdo con una realización, las células no singénicas con el injerto y singénicas con el sujeto hospedador son autólogas.

40 De esta manera, la presente divulgación contempla la administración a un sujeto de linfocitos Tcm anti-terceros (por ejemplo no singénicos ni con el sujeto ni con el injerto o no singénicos con el injerto y singénicos con el sujeto) lo cual da por resultado la erradicación de una enfermedad (por ejemplo leucemia o linfoma) y aumentará concomitantemente la incorporación de un trasplante de célula o de tejido (por ejemplo células de médula ósea autólogas o no autólogas) al ser células tolerogénicas y no GVHD.

45 Se apreciará que las células anti-terceros se pueden administrar concomitantemente con un injerto de célula o de tejido (por ejemplo con una terapia adyuvante), se pueden administrar antes del trasplante de un injerto de célula o de tejido (por ejemplo a fin de erradicar células cancerosas o residuales antes del trasplante y de eliminar el rechazo de injerto y la enfermedad de injerto contra hospedador) o se puede administrar después del trasplante de un injerto de célula o de tejido (por ejemplo a fin de erradicar células cancerosas residuales después del trasplante y de eliminar el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra hospedador).

50 Se apreciará que las células anti-terceros se pueden administrar en cualquier momento después del trasplante. Generalmente, los linfocitos Tcm anti-terceros se administran en el día 0, día 1, día 2, día 3, día 4, día 5, día 6, día 7, día 8 o día 10 después del trasplante. Sin embargo, los linfocitos Tcm anti-terceros se pueden administrar en tiempos prolongados después del trasplante, como por ejemplo, dos semanas, un mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses o 24 meses después del trasplante.

60 Los linfocitos Tcm anti-terceros se pueden administrar a través de cualquier método conocido en la técnica para el trasplante de células, tal como pero sin limitarse a, infusión de células (por ejemplo I.V.) o a través de una vía intraperitoneal.

65 Sin estar limitado por la teoría, una cantidad terapéuticamente es una cantidad, de linfocitos Tcm anti-terceros eficaz para la tolerización, efecto anti-tumor y/o reconstitución inmunitaria sin inducir GVHD. Puesto que los linfocitos Tcm

de la presente divulgación se alojan en los ganglios linfáticos después del trasplante, pueden ser necesarias cantidades menores de células (comparado con la dosis de células previamente usada, ver por ejemplo el documento WO 2001/049243) para lograr el efecto/s beneficioso de las células (por ejemplo, tolerización, efecto anti-tumor y/o reconstitución inmunitaria). Se apreciará que niveles menores de fármacos inmunosupresores pueden ser necesarios junto con los linfocitos Tcm de la presente divulgación (tal como exclusión de rapamicina del protocolo terapéutico).

La determinación de la cantidad terapéuticamente efectiva está perfectamente dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en la presente memoria.

Para cualquier preparación usada en los métodos de la divulgación, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente de ensayos de cultivo *in vitro* y celulares. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr una concentración o título deseado. Tal información se puede usar para determinar más con precisión dosis útiles en humanos.

Por ejemplo, en el caso de injerto de tejido el número de linfocitos Tcm anti-terceros perfundidos a un receptor debe ser más de 1×10^4 /kg de peso corporal. El número de linfocitos Tcm anti-terceros perfundidos a un receptor debe estar generalmente en el intervalo de 1×10^4 /kg de peso corporal a 1×10^9 /Kg de peso corporal.

A fin de facilitar la incorporación del injerto de célula o de tejido, el método puede comprender ventajosamente además acondicionar el sujeto con un régimen inmunosupresor antes de, concomitantemente con, o después del trasplante del injerto de célula o de tejido.

De esta manera, de acuerdo con una realización de la presente divulgación, el sujeto se condiciona bajo condiciones subletales, letales o supraletales antes del trasplante de un injerto de célula o de tejido.

Por ejemplo, el sujeto se puede tratar con un acondicionamiento mieloablativo o no mieloablativo. El tipo de acondicionamiento se puede determinar por una persona de experiencia ordinaria en la técnica y tiene en cuenta la edad y gravedad de la enfermedad del sujeto. De esta manera, por ejemplo, un sujeto de edad (por ejemplo una persona de más de 40 años de edad) se puede tratar con un régimen inmunosupresor suave.

Los ejemplos de tipos adecuados de regímenes inmunosupresores incluyen administración de fármacos inmunosupresores, poblaciones de células inductoras de tolerancia (como se describe con detalle en lo anterior en la presente memoria) y/o irradiación inmunosupresora.

La orientación amplia para seleccionar y administrar regímenes inmunosupresores adecuados para el trasplante se proporcionan en la literatura de la técnica (por ejemplo, véase: Kirkpatrick CH. and Rowlands DT Jr., 1992. JAMA. 268, 2952; Higgins RM. y colaboradores, 1996. Lancet 348, 1208; Suthanthiran M. y Strom TB., 1996. New Engl. J. Med. 331, 365; Midthun DE. y colaboradores, 1997. Mayo Clin Proc. 72, 175; Morrison VA. y colaboradores, 1994. Am J Med. 97, 14; Hanto DW, 1995. Annu Rev Med. 46, 381; Senderowicz AM. y colaboradores, 1997. Ann Intern Med. 126, 882; Vincenti F. y colaboradores, 1998. New Engl. J. Med. 338, 161; Dantal J. y colaboradores 1998. Lancet 351, 623).

Preferiblemente, el régimen inmunosupresor consiste en administrar por lo menos un agente inmunosupresor al sujeto.

Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxiclolorquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D- penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE), etanercept, bloqueadores de TNF-alfa, un agente biológico dirigido a una citocina inflamatoria y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, ácido acetil salicílico, salicilato de colina y magnesio, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina, paracetamol, ibuprofeno, inhibidores de Cox-2, tramadol, rapamicina (sirolimus) y análogos de rapamicina (tales como CCI-779, RAD001, AP23573). Estos agentes se pueden administrar individualmente o en combinación.

Como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos y expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluyen pero no se limitan a".

La expresión "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, método o estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solamente si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicadas.

Como se usa en la presente memoria, la forma singular “un”, “una”, y “el”, “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. Por ejemplo, la expresión “un compuesto” o “por lo menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

5 A lo largo de esta solicitud, varias realizaciones de esta invención se pueden presentar en un formato de intervalo. Se debe entender que la descripción en formato de intervalo es simplemente para conveniencia y brevedad y no se debe considerar como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, la descripción de un intervalo se debe considerar que ha divulgado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6
10 se debe considerar que tiene subintervalos específicamente divulgados tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de este intervalo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto aplica sin considerar la amplitud del intervalo.

15 Siempre que un intervalo numérico se indique en la presente memoria, se pretende que incluya cualquier número citado (fraccionario y entero) dentro del intervalo indicado. Las frases “que varía/varía entre” un primer número indicado y un segundo número indicado y “que varía/varía de” un primer número indicado “a” un segundo número indicado se usan en la presente indistintamente y se pretende que incluyan el primero y segundo números indicados y todos los números fraccionarios y enteros entre los mismos.

20 Como se usa en la presente memoria, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para lograr una tarea dada incluyendo, pero sin limitarse a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos ya sea conocidos por, o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

25 Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, para claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. A la inversa, varias características de la invención, que son, por brevedad, descritas en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar separadamente o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de varias
30 realizaciones no se van a considerar características esenciales de aquellas realizaciones, a menos que la realización sea inoperativa sin aquellos elementos.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención como se exponen anteriormente en la presente memoria y como se reivindican en la sección de reivindicaciones posterior encuentran apoyo experimental en los siguientes
35 ejemplos.

Ejemplos

40 Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención en una forma no limitante.

En general, la nomenclatura usada en la presente memoria y en los procedimientos de laboratorio usados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican detalladamente en la literatura. Ver, por ejemplo, “Molecular Cloning: A laboratory Manual”
45 Sambrook et al., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las expuestas en las patentes US-4.666.828; US-4.683.202; US-4.801.531; US-5.192.659 y US-5.272.057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Current Protocols in Immunology” Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la literatura de patentes y científica, ver, por ejemplo,
55 patentes US-3.791.932; US-3.839.153; US-3.850.752; US-3.850.578; US-3.853.987; US-3.867.517; US-3.879.262; US-3.901.654; US-3.935.074; US-3.984.533; US-3.996.345; US-4.034.074; US-4.098.876; US-4.879.219; US-5.011.771 y 5.281.521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R. I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) y “Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Los procedimientos de la presente memoria se cree que son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector. Toda la información contenida en la
60 presente memoria se incorpora en este documento a manera de referencia.

Materiales generales y procedimientos experimentales

Animales

- 5 Ratones BALB/c, CB6 (FI), FVB, C57BL/6, y BALB/c-NUDE de 6 a 12 semanas de edad hembras se obtuvieron de Harían Laboratories. La progenie de ratones B6-NUDE se reprodujeron en el Weizmann Institute Animal Center. Todos los ratones se mantuvieron en jaulas pequeñas (5 animales en cada jaula) y se alimentaron con alimento estéril y agua ácida. Todos los estudios se aprobaron por el Weizmann Institute of Science Institutional Animal Care and Use Committee.

Células

- 15 La línea de células de linfoma murino A20, línea de linfoma/leucemia de linfocitos B derivadas de BALB/c (H-2^d), descrita previamente [Kim KJ y colaboradores, J. Immunol. (1979) 122: 549-554] y el transfectante estable de A20, el A20 yfp/luc⁺, descrito previamente [Edinger M y colaboradores, Blood. (2003) 101: 640-648] se mantuvieron en un medio RPMI 1640 complementado con FCS al 5 %, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales, antibióticos y 2-β-mercaptoetanol 50 μM.

Preparación de Tcm anti-terceros no reactivos del hospedador

- 20 Los Tcm anti-terceros se prepararon como se describe previamente [Ophir E y colaboradores, Blood (2010) 115:2095-2104] brevemente, se cultivaron esplenocitos de los ratones donantes contra esplenocitos de terceros irradiados durante 60 horas bajo privación de citocina. Subsecuentemente, se seleccionaron positivamente células CD8⁺ usando Partículas Magnéticas (BD Pharmingen) y se cultivaron en un medio sin Ag. Se añadió rhIL-15 (20 ng/ml; R&D Systems) cada segundo día. Para lograr una población purificada al final del cultivo (día 16), los linfocitos Tcm se seleccionaron positivamente para la expresión de CD62L mediante clasificación de células activadas magnéticas [MACS, Milteny, Bergisch Gladbach, Alemania].

Análisis citométrico de flujo

- 30 Se llevó a cabo el análisis de clasificación de células activadas con fluorescencia (FACS) usando un FACScan de Becton Dickinson modificado. Las células se tiñeron con anticuerpos etiquetados específicos para CD8-ficoeritrina (PE)/isotiocianato de fluoresceína (FITC)/alofocianina (APC) (BD Pharmingen), CalceinAM (Molecular Probes, INC., Eugene, OR, EE.UU.). La tinción se realizó con Anexina V y 7-amino-actinomicina D (7AAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen).

Cultivo MLR y ensayo de citotoxicidad

- 40 Las células de linfoma y los linfocitos Tcm anti-terceros obtuvieron mediante centrifugación por gradiente de densidad Ficoll y las células de linfoma se etiquetaron con 0,15 μg/ml de CalceinAM (Molecular Probes, INC., Eugene, OR, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se llevó a una concentración de 1×10^6 células/ml en el medio requerido. Se incubaron 3×10^5 de las células de linfoma con CTL anti-terceros de acuerdo con las relaciones indicadas e intervalos de tiempo para placas de 24 pocillos. Las células se recubrieron y se analizaron para supervivencia usando marcadores de superficie tales como Anexina-V (BD) y midiendo el número de células de linfoma teñidas con CalceinAM mediante FACS.

Detección de apoptosis mediante tinción con Anexina V

- 50 Se usó APC Anexina V para detectar células apoptóticas. Las muestras de cultivos *in vitro* se incubaron con una mezcla de anticuerpos monoclonales seleccionados etiquetados con fluorocromos diferentes durante 20 minutos a 4° C. Después de lavar el anticuerpo libre no unido usando una solución tampón de unión a Anexina-V, las muestras se complementaron con 5 μl de Anexina V-APC (BD). A continuación, las células se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad y se lavaron con una solución tampón de unión a Anexina-V. Las muestras se analizaron mediante FACS para determinar las células vivas que se tiñeron positivamente de Anexina-V.

Modelo *in vivo* de enfermedad residual mínima

- 60 Ratones receptores BALB/c hembra de 12 semanas de edad se expusieron a una sola dosis de irradiación de cuerpo total (TBI) de 8 Gy de una fuente de rayos Gamma 150-A 60 Co (fabricado por Atomic Energy of Canada, Kanata, ON, Canadá) (día -1). Al siguiente día (día 0) los ratones receptores se infundieron intravenosamente con 3×10^6 de médula ósea agotada de linfocitos T de ratones BALB/c-Nude (singénicos) o con 3×10^6 de médula ósea agotada de linfocitos T de ratones B6-Nude, complementadas con 5×10^3 células de linfoma A20 luc por ratón. Al siguiente día (día +1) los ratones recibieron o no recibieron 10×10^6 de Tcm anti-terceros derivados de BALB/c (singénicos) o 5×10^6 de Tcm anti-terceros derivados de C57BL/6 (alogénicos), intravenosamente. La localización

del tumor, los patrones migratorios de las células A20 y la reactividad anti-linfoma de los CTL anti-terceros se examinaron usando un sistema de estudio de imagen *in vivo*.

Estudio de imagen *in vivo*

Se anestesiaron ratones con cetamina (100 mg/kg intraperitonealmente (i.p) (Kepro Holand, Holanda) y xilazina (Kepro Holand, Holanda) (20 mg/kg i.p), y se inyectó una solución acuosa de D-Luciferina (150 mg/kg i.p). (N.º Cat XR-1001, 30 mg/ml en PBS; Xenogen) 10 minutos antes del estudio de imagen. Los animales se colocaron en la cámara a prueba de luz del sistema estudio de imagen *In vivo* Imaging system (IVIS® 100, Xenogen) acoplada con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) Pixelfly QE (PCO, K, Alemania) en el Department of Veterinary Resources del Weizmann Institute. Se tomó una imagen de referencia de la superficie corporal en escala de grises (fotografía digital) después de una exposición de 10 segundos, bajo iluminación potente. El procesamiento de los datos de las imágenes y el análisis se llevaron a cabo con el software Living Image 2.5. Se hizo un control del crecimiento del tumor de los ratones desde el día 14 en intervalos semanales.

Análisis estadístico

El análisis de los datos de supervivencia se llevó a cabo usando curvas de Kaplan-Meier (prueba del rango logarítmico). La comparación de medios se condujo usando la prueba t de Student.

EJEMPLO 1

Establecimiento de un modelo de ratón

Para establecer un modelo de ratón apropiado, los inventores verificaron inicialmente que los linfocitos Tcm anti-terceros derivados de (B6 x BALB/c)F1 muestran destrucción independiente de TCR de las células de linfoma A20 de origen BALB/c ($34,8 \pm 12,1$ % en 4 experimentos, relación de linfocitos Tcm/células de linfoma 5:1, en comparación con células A20 incubadas sin Tcm, $p < 0,05$). Por otra parte, después de 16 horas de incubación con linfocitos Tcm, la tinción con AnexinaV de células A20 se aumentó significativamente comparado con el nivel de tinción basal ($14,8 \pm 4,5$ % y $5,2 \pm 2,2$ % respectivamente, en 3 experimentos, $p < 0,05$), lo que sugieren un mecanismo basado en la apoptosis, similar a aquel descrito previamente para la destrucción de células de linfoma humano [Lask A y colaboradores (enviado 2010); Arditti FD y colaboradores, Blood (2005) 105:3365-3371],

EJEMPLO 2

Protocolo de tratamiento para trasplante de médula ósea singénico y linfocitos Tcm

Usando células A20 que expresan luciferasa, los inventores fueron capaces de seguir el destino de las células malignas *in vivo* y estudiar el efecto anti-linfoma de los Tcm anti-terceros del donante añadidos al trasplante de médula ósea (BMT, en lo sucesivo) singénico o alogénico en un modelo de simulación de enfermedad residual mínima. En el modelo singénico, 3×10^6 células de médula ósea Nude BALB/c se trasplantaron en ratones BALB/c letalmente irradiados junto con 5000 células A20. Al siguiente día, se infundieron Tcm singénicos. Como se puede observar en las Figuras 1A-D, ninguno de los ratones no tratados sobrevivió (0/7) 100 días después del trasplante de médula ósea (BMT, mediana de la supervivencia 23 días). Sin embargo, la administración de 1×10^7 o 2×10^7 linfocitos Tcm singénicos condujo a una carga tumoral significativamente disminuida (Figuras 1E-H) y un aumento de la supervivencia total del 28 % de los ratones (2/7, $P < 0,0001$) y 40 % de los ratones (2/5, $P < 0,002$) 100 días después del BMT, con una mediana de la supervivencia de 49 y 80 días, respectivamente (Figura 1I).

EJEMPLO 3

Protocolo de tratamiento para trasplante de médula ósea singénico y linfocitos Tcm alogénicos

Un estudio previo llevado a cabo en el laboratorio de los inventores [Ophir E. y colaboradores, Blood (2010) 115: 2095-2104] mostró que los linfocitos Tcm anti-terceros estaban dotados de actividad tolerizante, lo que se traducía en persistencia prolongado después del BMT, incluso cuando se usaban donantes parcialmente compatibles. Los inventores sometieron a prueba por lo tanto en el modelo de BMT singénico descrito anteriormente el efecto anti-linfoma de 2×10^7 linfocitos Tcm derivados de F1 (CB6), reemplazando los linfocitos Tcm singénicos administrados previamente. Aunque era de esperar que estos linfocitos Tcm derivados de F1 se rechazasen debido a la incompatibilidad MHC, estos estaban continuamente presentes y no se rechazaron aun 2 meses después del trasplante (datos no mostrados). Su persistencia a largo plazo fue probablemente el resultado de su actividad tolerizante descrita anteriormente. El efecto clínico significativo de estos linfocitos Tcm, derivados de F1 se demostró por una supervivencia total mejorada del 57,1 % de los ratones (4/7, Figuras 2D-G) en comparación con la supervivencia del 0 % de los ratones (0/5, Figuras 2A-C y 2G) en el grupo no tratado. De esta manera, estos resultados muestran concluyentemente que los linfocitos Tcm anti-terceros, derivados de donantes alogénicos, se pueden usar como terapia celular contra neoplasias malignas de linfocitos B, ya sea solos o combinados con células de la médula ósea.

EJEMPLO 4

Protocolo de tratamiento para trasplante de médula ósea alogénico y linfocitos Tcm alogénicos

- 5 Cuando se examinaba en el contexto alogénico, se observaba una mayor erradicación del tumor. Este efecto fue probablemente debido a la alorreactividad residual que proporcionó un efecto de injerto contra leucemia/linfoma (GVL) adicional sobre la destrucción de células independientes del receptor de linfocitos T (TCR) recientemente descubierto. Significativamente, este efecto aditivo se logró sin provocar GVHD. En este modelo alogénico, se
- 10 trasplantaron 3×10^6 células de médula ósea Nude B6 alogénicas junto con 5000 células A20 en ratones BALB/c letalmente irradiados. Al siguiente día, los ratones se trataron con Tcm de tipo donante. De forma similar a los resultados obtenidos en el modelo singénico (descrito en el Ejemplo 2 y 3, anterior), ninguno de los ratones no tratados sobrevivió 100 días después del BMT (0/8, mediana de la supervivencia 23 días, Figuras 3A-D y 3I), mientras que la administración de 5×10^6 linfocitos Tcm de tipo donante, condujo a una supervivencia total notable de 100 % (7/7) 100 días después del BMT (Figuras 3E-I). Aunque los linfocitos Tcm alogénicos mostraron actividad
- 15 de GVL aumentada comparado con los linfocitos Tcm singénicos, este efecto no se asoció con ninguna manifestación de GVHD. De esta manera, como se ha descrito previamente, el peso y apariencia total de los ratones que reciben linfocitos Tcm anti-terceros alogénicos fueron los mismos que los de los ratones en el grupo de control, radioprotectidos con un trasplante de médula ósea Nude solo.
- 20 En conjunto, los presentes inventores demostraron por primera vez, mediante estudios de imagen *in vivo*, la reactividad GVL de los Tcm anti-terceros murinos. Estos resultados sugieren que los linfocitos Tcm anti-terceros pueden proporcionar un "doble efecto de apoyo" al promover tanto la incorporación del injerto de médula ósea, como inducir concurrentemente la reactividad GVL sin provocar GVHD. Dicha terapia celular es muy atractiva, en particular para pacientes de edad con B-CLL y otras neoplasias malignas de linfocitos B que no podrían tolerar el
- 25 acondicionamiento agresivo y se puede desarrollar potencialmente en un producto comercial fácilmente disponible, que se usa como una terapia de células anti-cáncer.

EJEMPLO 5

Generación de linfocitos T de memoria central anti-terceros

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Enriquecimiento de linfocitos T CD8+ indiferenciados

- 35 Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación con gradiente de densidad Ficoll de capas leucocitarias de donantes sanos. Las PBMC del donante se transfirieron a continuación a una solución de congelación de DMSO al 10 % y se crioconservaron en nitrógeno líquido.
- 40 En el día -2: las PBMC congeladas del donante se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37 ° C y se transfirieron a un medio de descongelación caliente (Cellgro DC complementado con suero humano al 10 % y medio Pen/Strep suplementado con Nucleasa Benzonase® para evitar la formación de grumos de células como resultado de la deshidratación de las células). Las PBMC del donante descongeladas se lavaron dos veces con medio de descongelación caliente. A fin de agotar las células adherentes, las PBMC del donante se resuspendieron después
- 45 en un medio de cultivo (Cellgro DC complementado con suero humano al 5 % y Pen/Strep y 10 ng/ml de IL-7) y se colocaron en placas en placas de 6 pocillos especialmente recubiertas para incubación durante la noche a 37° C.
- En el día -1: Se extrajeron las células no adherentes (este proceso incrementó la concentración de los linfocitos T deseados, eliminado los monocitos adheridos y además se permitió que las células descongeladas se recuperaran del proceso de descongelación antes de ser sometidos al proceso de enriquecimiento magnético).
- 50 En el día 0: Se aislaron linfocitos T CD8+ no tocados usando el equipo de aislamiento CD8 de Miltenyi de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después, los linfocitos T CD8 con fenotipo indiferenciado se obtuvieron de la población CD8 total mediante el agotamiento de las células que expresan el marcador de activación CD45RO usando cuentas magnéticas CD45RO.
- 55

Generación de células dendríticas (DC) derivadas de monocitos

- 60 Las DC derivadas de monocitos se generaron de PBMC crioconservadas alogénicas. Los monocitos se enriquecieron de las PBMC mediante adherencia plástica y se cultivaron en GM-CSF e IL-4 durante el transcurso de 3 días. Se indujo la maduración durante las últimas 24 horas del cultivo con la adición de LPS e IFN- γ .

Generación de linfocitos Tcm anti-terceros (linfocitos T CD8 indiferenciados dirigidos a DC derivadas de monocitos)

- 65 Los linfocitos T CD8+ indiferenciados se activaron con DC derivadas de monocitos irradiadas (30 Gy) en una relación de 1:0,25, en un medio de cultivo (Cellgro DC complementado con suero humano al 5 % y Pen/Strep)

complementado con IL-21 durante 3 días. Después, los linfocitos T CD8+ no recibieron activación adicional y se desarrollaron con IL-7 e IL-15 hasta el día 12.

RESULTADOS

En el día 11 de cultivo, la composición celular y el fenotipo de las células se evaluaron usando análisis FACS y el número de células se determinó por exclusión con azul de tripano. Los resultados indicaron que la composición de células (de Lymphogate, los datos no se muestran) comprendía predominantemente 94,6 % de linfocitos T CD8+ (CD3+CD8+), con trazas de 1,2 % de células NK CD56+ (CD3- CD56+) y 1,1 % de linfocitos T NK (CD3+CD56+). Adicionalmente, los linfocitos T CD8+ comprendía predominantemente 76 % de linfocitos Tcm, 9 % de linfocitos indiferenciados, 8,5 % de Teff/Tem y 6,5 % de Temra.

EJEMPLO 6

Ensayo de injerto de Tcm contra leucemia (GVL)

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Ensayo GVL

Las líneas de linfocitos B se etiquetaron con 0,15 µg/ml de CalceinAM, un tinte vital que se libera durante la muerte de las células, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, $0,3 \times 10^6$ de líneas de células etiquetadas con calceína se incubaron con o sin $1,5 \times 10^6$ Tcm anti-terceros durante 22 horas en placas de 24 pocillos. Las citocinas no exógenas se añadieron al MLR. Después de 22 horas las células se recuperaron y se analizaron para determinar la supervivencia midiendo el número de linfocitos teñidos con calceína supervivientes mediante FACS.

Para obtener valores absolutos de células, las muestras se suspendieron en volumen constante y se obtuvieron los recuentos citométricos de flujo para cada muestra durante un período de tiempo predeterminado, constante y se compararon los recuentos citométricos de flujo obtenidos con volumen fijo y números fijos de células de entrada.

Detección de apoptosis

Para la detección de la apoptosis por tinción con AnexinaV, las muestras se incubaron con 5 µl de AnexinaV-APC (BD) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la AnexinaV no unida se lavó y las muestras se analizaron mediante FACS.

REIVINDICACIONES

1. Un método de generación *in vitro* de una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), comprendiendo dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) un distintivo $CD8^+/CD62L^+/CD45RO^+$ y en el que al menos el 50 % de la población de células aislada tienen dicho distintivo, siendo dichas células, células que inducen tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante, comprendiendo el método:
 - (a) poner en contacto las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21 en condiciones que permiten la eliminación de las células reactivas GVH y
 - (b) cultivar dichas células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-15 en un entorno libre de antígeno en condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), generando de ese modo la población de células aislada.
2. Una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), comprendiendo dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) un distintivo $CD8^+/CD62L^+/CD45RO^+$ y en el que al menos el 50 % de la población de células aislada tienen dicho distintivo, siendo dichas células, células que inducen tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante, para su uso como un tratamiento adyuvante para la erradicación de una enfermedad en un sujeto que ha sido trasplantado con un injerto de célula o de tejido no singénico, en el que dichas células son:
 - (i) no singénicas con el sujeto y dicho injerto o
 - (ii) no singénicas con dicho injerto y singénicas con el sujeto.
3. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho injerto de célula o de tejido no es autólogo y dicha población de células aislada son autólogas.
4. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho injerto de célula o de tejido y dicha población de células aislada son de diferentes donantes.
5. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha enfermedad comprende una neoplasia maligna y opcionalmente una neoplasia maligna de linfocitos B.
6. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho injerto comprende células de médula ósea y opcionalmente células hematopoyéticas inmaduras.
7. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dichas células hematopoyéticas inmaduras no son singénicas con el sujeto y dicha población de células aislada son singénicas con el sujeto.
8. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dichas células hematopoyéticas inmaduras no son autólogas y dicha población de células aislada son autólogas.
9. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dichas células hematopoyéticas inmaduras no son singénicas con el sujeto y dicha población de células aislada no son singénicas ni con el sujeto ni con dicho injerto.
10. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dichas células hematopoyéticas inmaduras y dicha población de células aisladas son de diferentes donantes.
11. El método de la reivindicación 1 o la población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dichos ganglios linfáticos comprenden ganglios linfáticos periféricos o ganglios linfáticos mesentéricos.
12. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dichas células no son singénicas con dicho injerto y singénicas con el sujeto comprenden células autólogas.
13. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de células aislada que comprende células anti-terceros que no inducen enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), comprendiendo dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) un distintivo $CD8^+/CD62L^+/CD45RO^+$ y en el que al menos el 50 % de la población de células aislada tienen dicho distintivo, siendo dichas células, células que inducen tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después del trasplante, para su uso como un tratamiento adyuvante para la erradicación de una enfermedad en un sujeto que ha sido trasplantado con células hematopoyéticas inmaduras y en el que además cuando dichas células

hematopoyéticas inmaduras son singénicas con el sujeto, dicha población de células aislada se selecciona para que sea singénica con el sujeto o no singénica con el sujeto.

5 14. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dichas células hematopoyéticas inmaduras y dicha población de células aislada son autólogas o en la que dichas células hematopoyéticas inmaduras son autólogas y dicha población de células aislada no es autóloga.

10 15. La población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 13, en la que dichas células anti-terceros tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo dichas células, células que inducen tolerancia y capaces de alojarse en los ganglios linfáticos después de un trasplante se genera:

15 (a) poniendo en contacto las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un antígeno o antígenos de terceros en presencia de IL-21 en condiciones que permiten la eliminación de las células reactivas GVH y (b) cultivando dichas células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-15 en un entorno libre de antígeno en condiciones que permiten la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), generando de ese modo la población de células aislada.

20 16. El método de la reivindicación 1, o población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dichas condiciones que permiten la eliminación de las células reactivas GVH comprenden cultivar durante 1-5 días.

17. El método de la reivindicación 1, o población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho cultivo en presencia de IL-15 se efectúa durante 3-30 días.

25 18. El método de la reivindicación 1, o población de células aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dichas condiciones que permiten la proliferación de las células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) comprenden además IL-7 y/o IL-21.

30 19. La población aislada para su uso de células de acuerdo con la reivindicación 2 o 13, en la que dicha enfermedad comprende leucemia o linfoma.

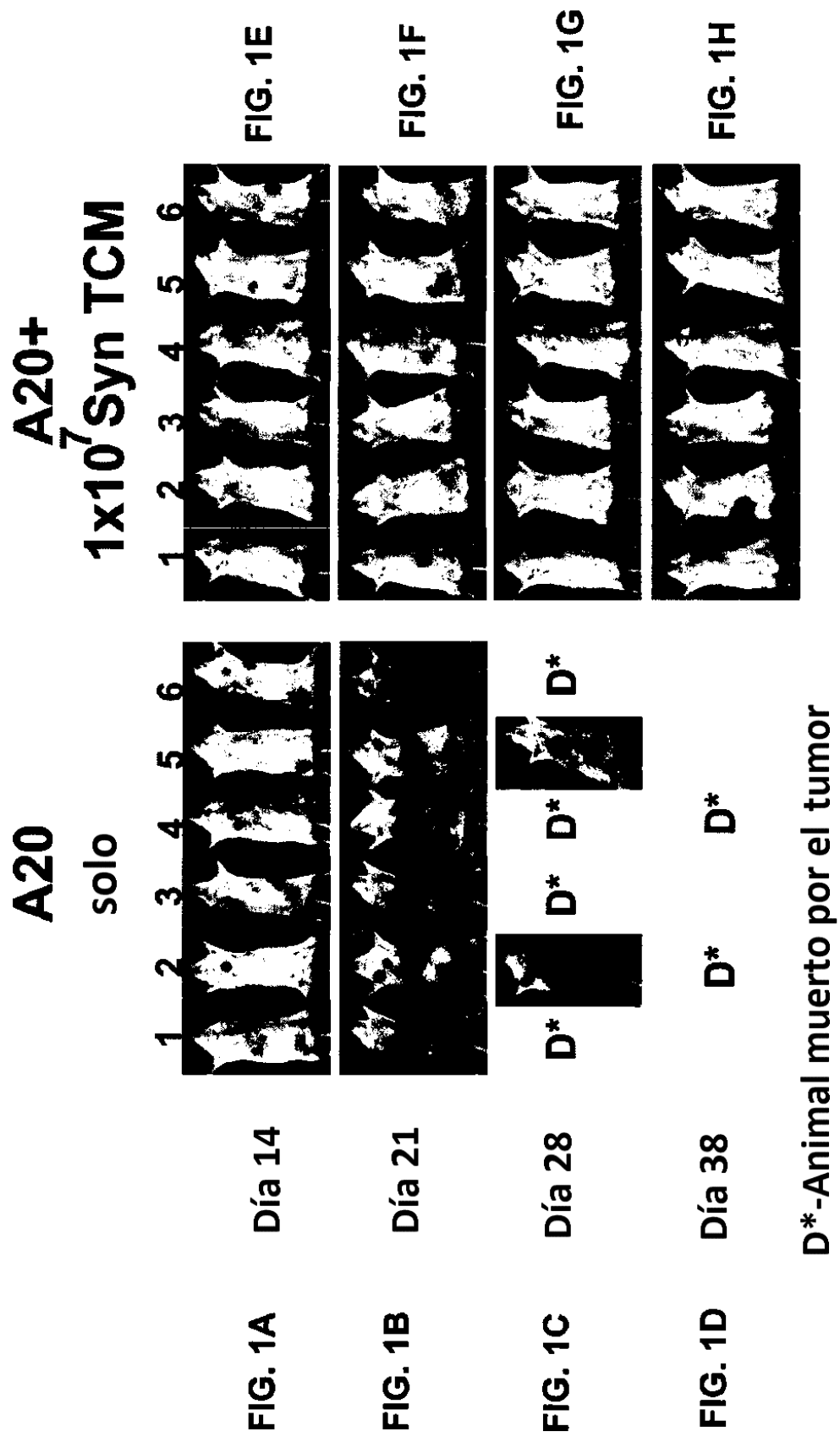
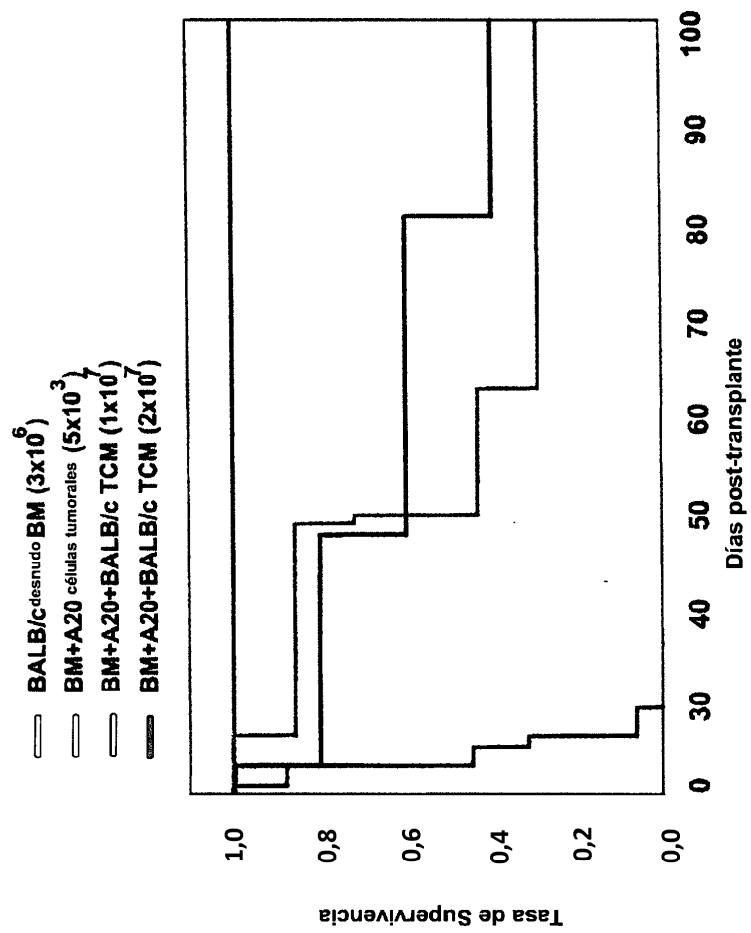
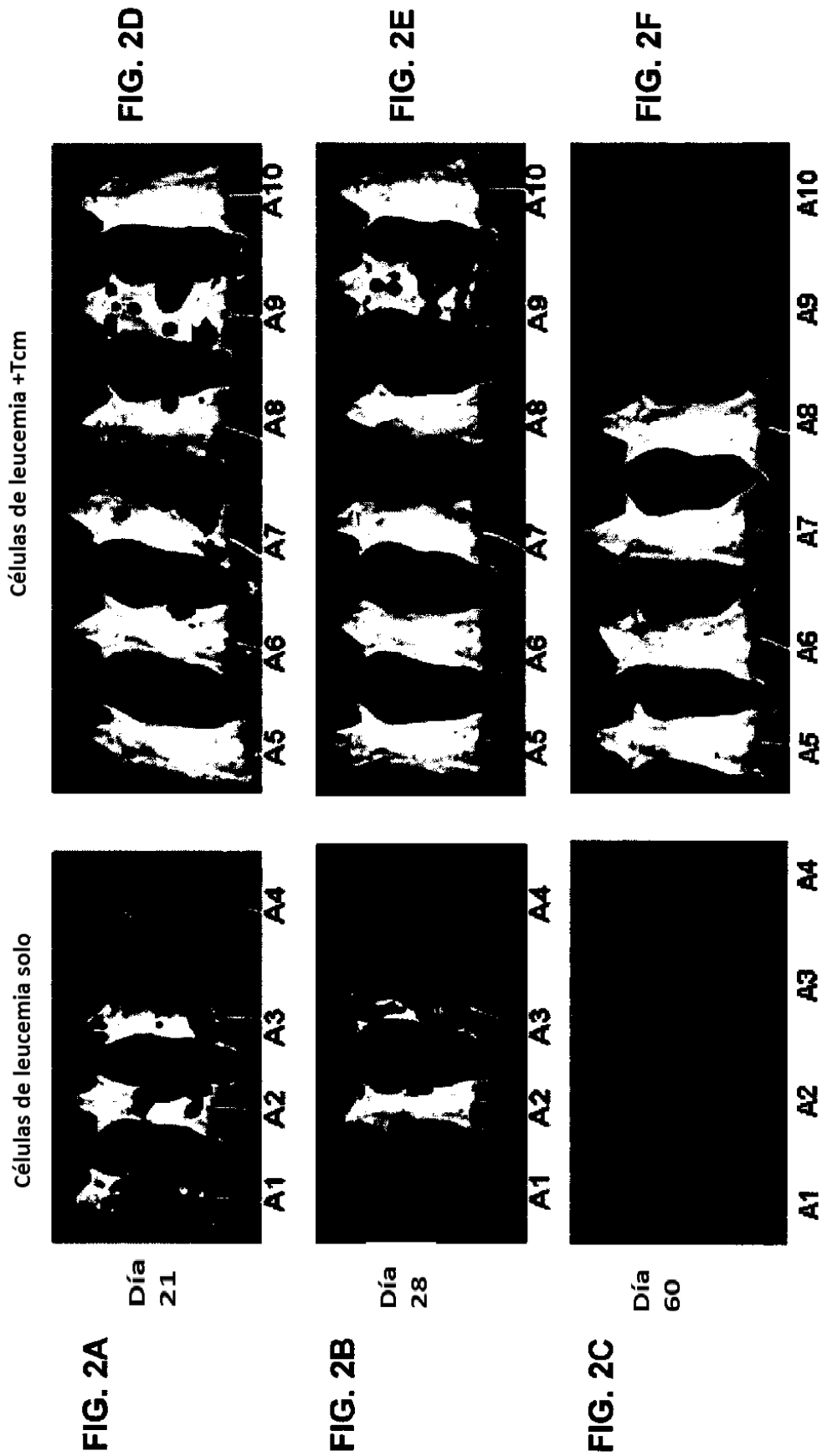
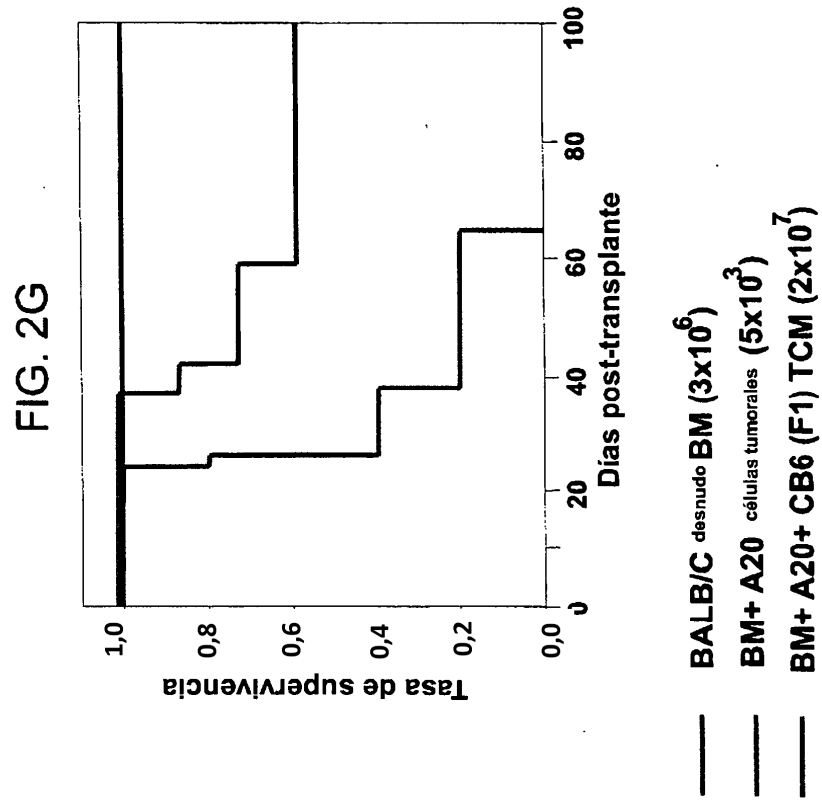
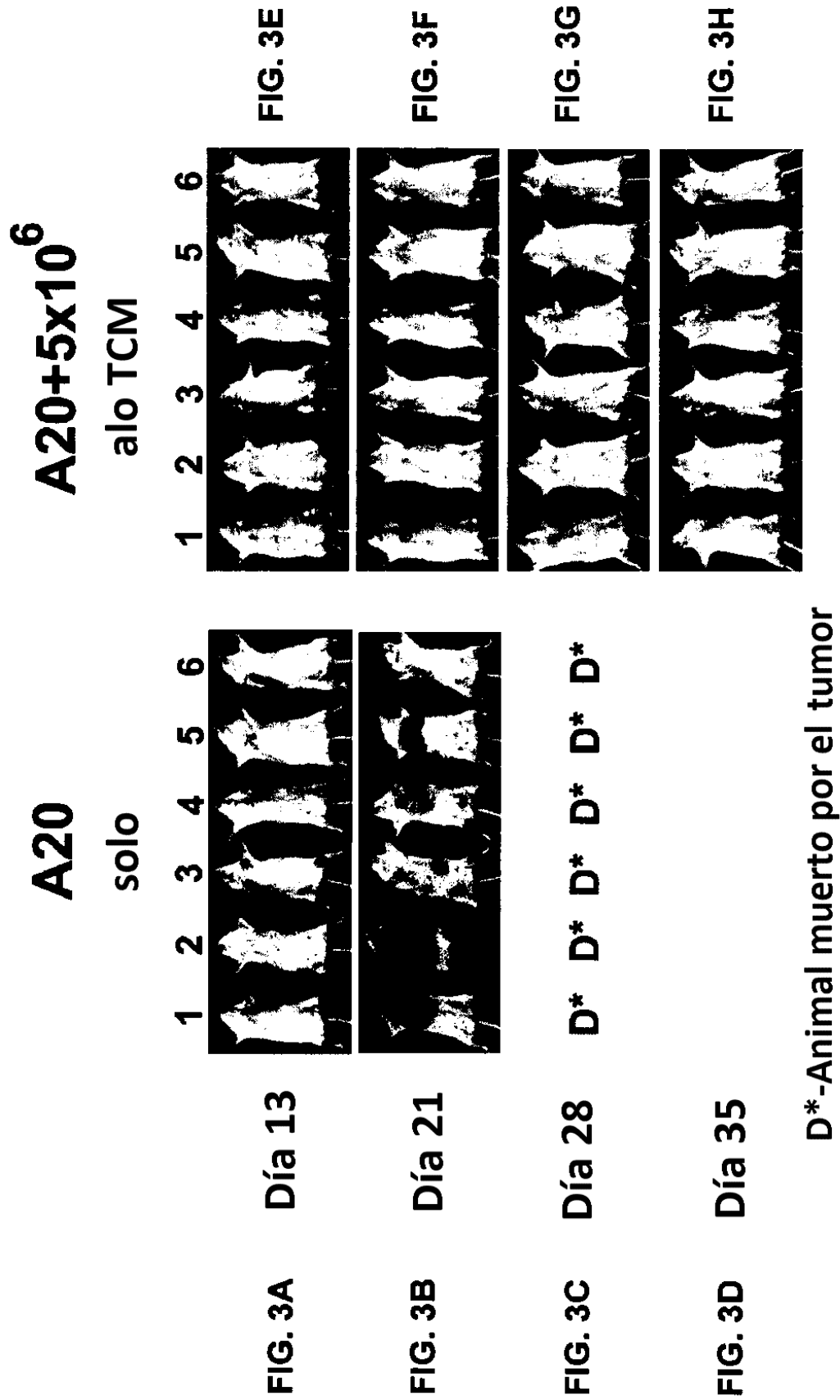


FIG. 1I



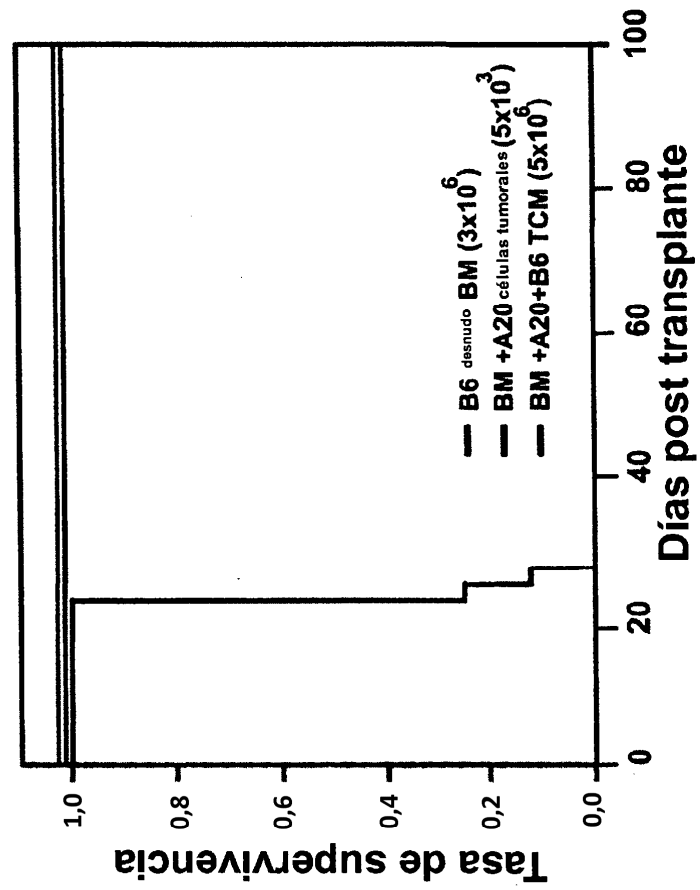






D*-Animal muerto por el tumor

FIG. 3I



Proliferación usando alo-DC como APC
(Resumen de 10 experimentos independientes)

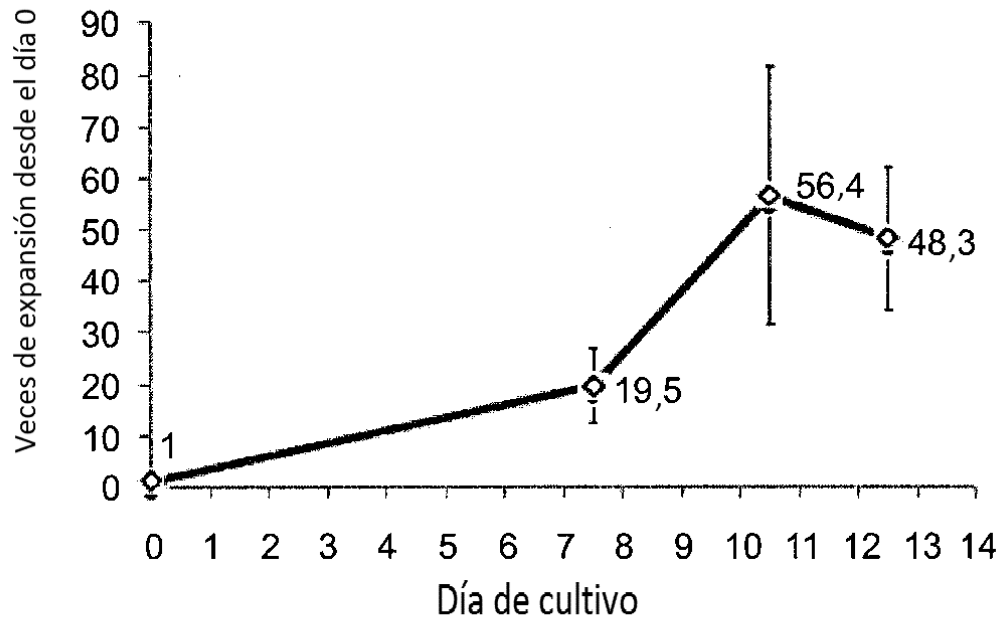


FIG. 4A

Fenotipo celular usando Alo-DC
(Resumen de 10 experimentos independientes)

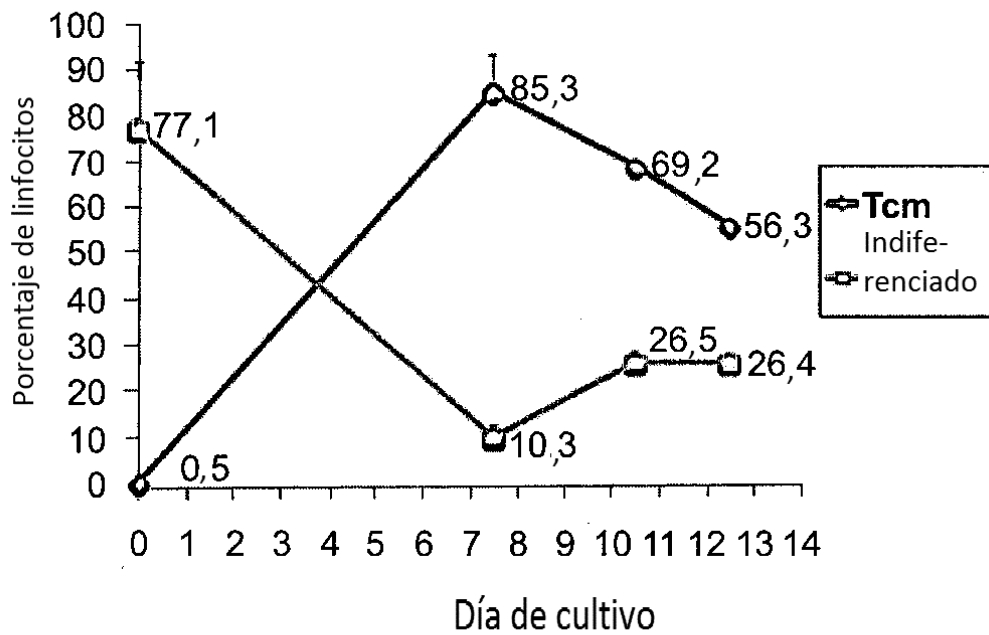


FIG. 4B

FIG. 5

% de células apoptóticas después de 22 h de MLR
con líneas celulares de linfoma de linfocitos B y de leucemia de
células plasmáticas

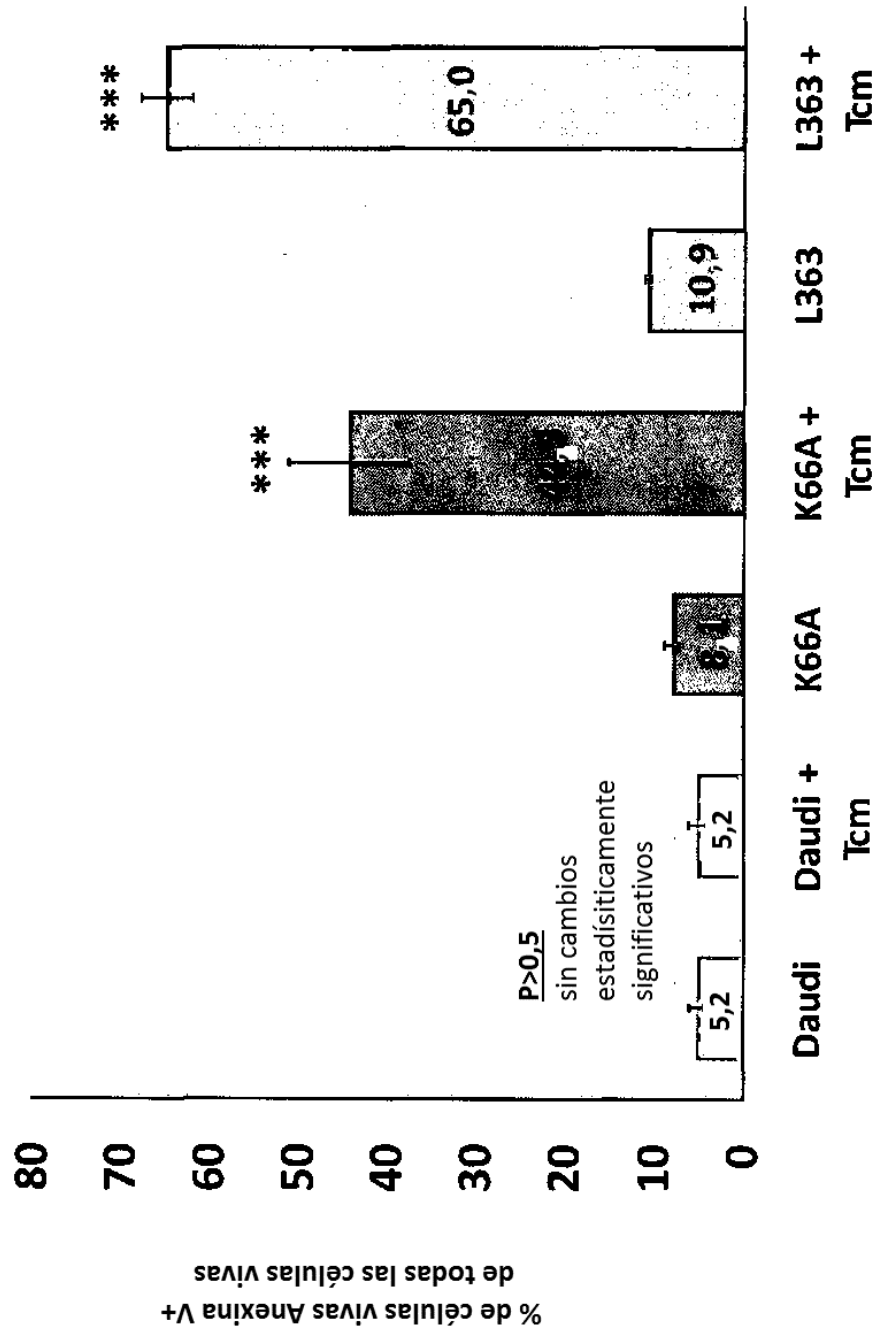


FIG. 6

Número de células vivas después de 22 h de MLR
con líneas celulares EBV-LCL de linfoma de linfocitos B y
de leucemia de células plasmáticas

