

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 418**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2007 PCT/US2007/021326**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2008 WO08045286**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2007 E 07852532 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2079830**

54 Título: **Preparación de células presentadoras de antígeno artificial inactivado y su uso en terapias celulares**

30 Prioridad:

04.10.2006 US 849299 P

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

27.02.2017

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es:

**CAI, ZELING;
MORIARTY, ANN;
DEGRAW, JULI;
LETURCQ, DIDIER;
SHI, WEI-XING;
STEGMAN, KAREN KABAT y
YUE, XILIAN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 603 418 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).

Preparación de células presentadoras de antígeno artificial inactivado y su uso en terapias celulares**DESCRIPCIÓN**5 ARCHIVO DE DIVULGACIÓN:

[0001] La presente divulgación en general se refiere a los métodos para el procesamiento de terapia celular para tratar enfermedades, desórdenes o condiciones médicas tales como el cáncer, mediante la inactivación artificial de CPA a través de la reticulación.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

[0002] Para facilitar una apreciación de esta invención, en esta sección se discutirán los antecedentes históricos y técnicos destacados para el desarrollo de esta invención, se incluyen observaciones, conclusiones y los puntos de vista que podrían ser únicos para un inventor. Por lo tanto, las declaraciones de los antecedentes en el presente documento no deben interpretarse como un reconocimiento con respecto al contenido de la técnica mencionada.

20

[0003] Numerosas terapias han sido desarrolladas para tratar diversos tipos de cáncer. Muchas de estos esfuerzos se ha centrado en regímenes quimioterapéuticos. En la combinación particular de régimen de quimioterapia designado como tratamiento para el melanoma metastático, la tasa de respuesta de 35-50% fue reportada con el "Régimen de Dartmouth" (una combinación de dacarbazina (DTIC), cisplatino, carmustina (BCNU), y tamoxifeno), sin embargo la duración de supervivencia se ha mantenido de 6 a 10 meses. Así mismo se han reportado altas tasas de remisión en altas dosis agresivas de quimioterapia (Hryniuk et al., J. Clin Oncol. Vol. 4, pp. 1162-1170 (1986)) y la repleción de la hematopoyesis con los trasplantes autólogos de médula ósea. Sin embargo, la duración media de supervivencia fue baja, aproximadamente de cuatro meses (Herzig, High-Dose Cancer Therapy: Pharmacology, Hemat- opoietins, Stem Cells (Armitage and Antman, eds.), Williams and Wilkins (Baltimore), pp. 750-754(1992)).

25

30

[0004] En el transcurso de varios años, se han observado mejoras significativas de supervivencia en un pequeño porcentaje de pacientes con melanoma que se han sometido a ciertas inmunoterapias. Inmunoterapias que han incluido la inmunoterapia específica activa con vacunas contra el cáncer, así mismo con el uso de re-vacunación no específica del sistema inmune, tal como interleucina-2 (IL-2) e interferón-alfa (IFN- α) Saunders (Philadelphia), pp. 57-69 (1995); Mitchell et al., J. Clin. Oncol., Vol. 12, pp. 402-411 (1994)). Véase también publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2003/0022820.

35

[0005] La identificación de antígenos tumorales definidos de células T en el melanoma, ha llevado a ensayos clínicos que se enfocan en las células cancerosas intentando aumentar la respuesta inmune celular específica del antígeno. Este enfoque se ha adoptado en numerosas estrategias de vacunación en el cual los antígenos son entregados en un contexto inmunogénico intentando inducir respuestas de potente

40

30 células T *in vivo*. Aunque algunas respuestas clínicas han sido observadas en ensayos de vacunas, la magnitud de la respuesta de las células T inducidas, ha sido generalmente baja o indetectable y poco correlacionada con las respuestas clínicas. La inmunización de pacientes con melanoma con antígenos del cáncer pueden aumentar el número de precursores de CTL en la circulación; sin embargo, no se ha correlacionado con la regresión tumoral clínica, sugiriendo un defecto en la función o activación *in vivo*.

45

[0006] Los estudios en ratones de modelos tumorales han demostrado que la inmunoterapia adoptiva, que implica la inmunización *in vitro* 35 de células T específicas para uno o más antígenos tumorales, puede ser eficaz con una toxicidad mínima. Un obstáculo en la aplicación de esta estrategia al tratamiento de los tumores en humanos, ha sido la identificación de los antígenos inmunogénicos que hacen las células tumorales susceptibles a la destrucción mediada por CTL. El aislamiento de las células T reactivas a tumores de pacientes con melanoma ha llevado a la identificación de algunos de los antígenos tumorales (epítomos) que dirigen a los CTL. Estos incluyen tirosinasa, MART-1/Melan A, gp100, y MAGE. De estas, tirosinasa y MART-1 casi se manifiestan universalmente en melanoma y por lo tanto representan una elección de objetivo deseado para la inmunoterapia adoptiva Med. Vol. 179, pp. 921-930 (1994); Kawakami et al., J. Exp. Med., Vol. 180, 347-352 (1994); Brichard et al., J. Exp. Med., Vol. 178:489-495, 1993; Robbins et al., Cancer Res. 54:3124-3126, 1994; Bakker et al., J. Exp. Med. Vol. 179, pp. 1005-1009 (1994); Wolfel et al., Eur. J. Immunol. Vol. 24, pp. 759-764 (1994); and Visseren et al., J. Immunol. Vol. 154, pp. 3991-3998 (1995)).

50

55

60

[0007] La terapia adoptiva de células T involucra la extracción de las células T del ambiente huésped en donde los mecanismos tolerogénicos están activos *in vivo* en pacientes con cáncer y contribuyen a las respuestas ineficaces demostradas en esta población de pacientes. Las células T CD8+ pueden ser estimuladas *ex vivo* para generar en los CTL antígeno-específico (véase p. ej. Patente U.S. No. 6,225,042). Los enfoques de inmunoterapia adoptiva temprana emplearon linfocitos activados como tratamiento para varios tipos de cáncer (Rubin et al., Biological Approaches to Cancer Treatment. Biomodulation (Mitchell, ed.), McGraw-Hill (New York), pp. 379-410 (1993)).

65

Se usaron inicialmente, células asesinas activadas por linfocinas (LAK), y después linfocitos infiltrantes del tumor (TIL), activados *ex vivo* con IL-2, pero la demostración de la eficacia fue equívoca. Estos prematuros ensayos clínicos controlados no demostraron una ventaja para el uso de las células activadas *ex vivo* en la administración

directa de IL-2 en los pacientes con melanoma. Los estudios más recientes hechos por Yee et al. at Fred Hutchinson Cancer Research Center (Yee et al., PNAS, Vol. 99, pp. 16168-16173, (2002)) y Dudley et al. at NCI (Dudley et al., Science, Vol. 298, pp. 850-854 (2002)) han demostrado el potencial para ciertos enfoques de terapia adoptiva de células T. Estos estudios implican ya sea el uso de clones de células T específicas MART-1 o gp100 y dosis bajas de IL-2, o TIL expandidos *ex vivo* con células alimentadoras alogénicas y altas dosis de IL-2. Estos estudios confirman que la terapia de inmunoterapia adoptiva promete ser una terapia contra el cáncer, aunque su pleno desarrollo se ha visto obstaculizado por la falta de métodos reproducibles para la generación *ex vivo* de números terapéuticos del antígeno-específico CD8+ de los CTL (Oelke et al., Nat. Med., Vol. 9:619-624(2003)).

[0008] Las células T CD8+, citolítico, citotóxico son un importante mecanismo de defensa contra las infecciones virales. Los linfocitos T CD8+ específicamente reconocen y rompen la membrana celular del huésped que está infectada con un virus. Aunque sería deseable potenciar la actividad citotóxica de los CTL, muy pocos procedimientos *in vitro* han estado disponibles para activar específicamente a los CTL. La identificación de la clave para los antígenos asociados al melanoma y un método específico de activación *in vitro* de los CTL, permite una evaluación eficaz de la inmunoterapia adoptiva para el melanoma metastásico (veáse, además de Yee et al., Dudley et al., y Oelke et al., *supra*, and Leturcq et al., "Ex Vivo Generation of Potent Cytotoxic T Lymphocytes for the Treatment of Cancer: A Novel Antigen Presentation System", Society of Biological Therapy 17th Annual Meeting, Abstract #40 (2002))

[0009] Si bien es posible utilizar naturalmente células que presentan antígeno (CPAs) para la activación de células T naive *in vitro* (p. ej. las células dendríticas, macrófagos, células B, o células tumorales autólogas), la eficiencia de la activación es baja ya que las moléculas de CMH de las CPA naives contienen muchos otros epítopes de péptidos, permitiendo de este modo la presentación mínima de los epítopes seleccionados. La mayoría de estos péptidos presentados, representan proteínas endógenas normales inofensivas. Un enfoque más directo a este problema, sería activar las células T CD8+ concretamente en aquellos epítopes relacionados a la lucha contra esta enfermedad.

[0010] Una CPA artificial es una xCPA que se ha desarrollado utilizando la línea celular embrionaria de la *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) la cual expresa el complejo de mayor histocompatibilidad (CMH) de moléculas clase I (Leturcq et al., *supra*; Jackson et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 12117-12121(1992); veáse también U.S. Patent Nos. 6,225,042 y 6,355,479). Dado que *Drosophila* carece de un sistema inmune avanzado, homólogos al humano de *Drosophila* TAP-1 y transportadores peptídicos 2, los cuales están implicados en la carga de epítomos de péptidos en las moléculas CMH humana, estos están ausentes. Por tanto, moléculas transfectadas de clase I y de clase II aparecen en la superficie de células de *Drosophila* como recipientes vacíos. Incubando células transfectadas de *Drosophila* con CMH de clase I o CMH de clase II codificando los vectores de expresión con péptidos sintéticos exógenos que se unen a las moléculas específicas CMH (es decir, los epítomos de péptido antigénico tumoral de células T), todas las moléculas de CMH disponibles pueden estar ocupadas con CMH-restringido, epítomo péptido específico (s). En particular, la alta densidad de expresión de moléculas CMH de clase I que presentan uno o múltiples epítomos, y la incorporación moléculas clave coestimuladoras B7-1 (CD80), CD70, LFA-3 (CD58), y ICAM-1 (CD54) en estos CPAs de *Drosophila*, pueden permitir la generación *in vitro* de potentes células T CD8+ autólogas citotóxicas que son específicos para los péptidos seleccionados (Cai et al., Immunol. Rev., Vol. 165, pp. 249-265 (1998)).

[0011] Se han desarrollado numerosas mejoras en la terapia celular. Veáse, p. ej. las siguientes publicaciones de patentes: U.S. Patent Números: 5,314,813, 5,529,921, 5,827,737, 6,001,365, 6,225,042, 6,251,627, 6,255,073, 6,362,001, 6,461,867, 6,790,662, y 6,828,150; WO 2002/065992 y 2002/092773; y EP 814,838. Por ejemplo, se han realizado tres estudios clínicos (haciendo referencia a CTL-01, CTL-02 y CTL-03) en pacientes con melanomas malignos avanzados, en donde se aislaron células T CD8+ autólogas de los pacientes, estimuladas y expandidas *ex vivo*, antes de ser devueltas a los pacientes como linfocitos T citotóxicos de antígeno-específico (CTLs). La capacidad de generar de forma reproducible potente antígeno-específico CTLs *ex vivo* implica una estimulación primaria con una línea celular embrionaria de *Drosophila melanogaster* (SC2) que se transfecta con HLA humana clase I, moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión las cuales son importantes para la óptima activación de células T. El células transfectadas son utilizadas como células presentadoras de antígeno artificial para estimular a las células T naive CD8+ para conducir las a células efectoras con actividad citotóxica en contra de células blanco que expresan la proteína a la que los CTL fueron inmunizados en contra las *in vitro*. Dos diferentes líneas artificiales CPA han sido usadas en estos estudios clínicos. Una expresando HLA-A2, B7.1 y ICAM (clone 666) y la otra expresando estas tres moléculas, más B7.2 y LFA-3 (clone 668).

[0012] Una producto de terapia celular designada CTL-04, que está siendo experimentada por la investigación clínica, ha sido desarrollada con el *Drosophila*-basada en las CPAs. El producto de terapia celular es un producto inmunoterapéutico autólogo preparado con *ex vivo* CTLs CD8+ autólogos activados que exhiben especificidad de péptido de hasta seis HLA-A2.1 de péptidos restringidos seleccionados de antígenos asociados al melanoma identificados por secuencias, enumeradas en SEQ ID Números:5, 6, 7, 8, 9, y 70. El componente activo del producto de terapia celular son las propias células CD8+ del paciente, las cuales han sido activadas *ex vivo* por exposición para seleccionar a las CPAs cargado de péptido teniendo especificidad para al menos uno de los seis péptidos

restringidos HLA-A2.1 listados en la Números de SEQ ID proporcionados anteriormente. Estos CTL son: derivadas de las células naive autólogas aisladas de muestras de aféresis linfática recolectadas en un centro clínico; preparados *ex vivo* frente a los epítomos de péptidos antigénicos usando melanoma artificial, inactivado de células de *Drosophila* como las CPAs; expandido por reestimulación con monocitos autólogos cargados con los epítomos antigénicos de melanoma en la presencia de Interleucina-2 (IL-2) y la Interleucina-7 (IL-7), seguido por la expansión no-específica usando OKT³; recolectado, lavado y re-suspendido en formulación final para infusión; e infundido en el paciente. El producto final para la re-infusión contiene 1-10 x 10⁹ células CTL en 300 mL de Lactato de Ringer solución inyectable (76% v/v), 5% de dextrosa en solución salina normal (D5NS) (4% v/v), y albúmina de suero humano (HSA) (20% v/v).

[0013] Por supuesto, como con cualquier fármaco, es importante garantizar la seguridad y eficacia del producto terapéutico. Por tanto, antes de que un producto de terapia celular tal como CTL-04 se libere para su uso clínico, normalmente es sometido a diversas pruebas de garantía de calidad. Por ejemplo, el producto de terapia celular puede ser analizado para confirmar la ausencia de ADN de *Drosophila* por la técnica basada en PRC. Adicionalmente, el producto puede ser sometido al RT/PCR para confirmar la ausencia de ARN de virus conocidos por insectos endógenos específicos, tales como *Drosophila* Nodavirus (DrNV); virus X de *Drosophila* (DXV), y como el virus de la *Drosophila* HPS-1. Además, el BacT/Alert[®] puede ser utilizado para poner a prueba el proceso y la esterilidad del producto final. La prueba de esterilidad de los productos de células NIH por el Departamento de Medicina de Transfusión de hongos, bacterias, y el contenido de endotoxinas se menciona en la patente de U.S. Publicación de la solicitud No. US 2006/0159667. WO 96/27393 se refiere a la activación de los linfocitos T usando CPAs, y el uso de linfocitos T activados. WO 00/54802 describe el uso de agentes fotosensibilizantes tales como AIPcS2a (aluminio ftalocianina disulfonato) en un proceso llamado internalización fotoquímica para la mejora de la captación de antígenos y el procesamiento por las células presentadoras de antígenos. US6355479 se refiere a matrices presentadoras de antígeno sintéticas, a sus métodos de fabricación y a sus métodos de uso.

[0014] A pesar de la seguridad y la eficacia de este tipo de terapias celulares, sigue existiendo el deseo de desarrollar terapias celulares que garanticen ser además de seguras, potentes, especialmente en función de la FDA, reclasificar tal terapia celular como un producto de los xenotrasplantes. Esta clasificación requiere un conjunto separado de reglas generales, que incluye una mención específica de la droga como un producto de los xenotrasplantes, posible riesgo de infecciones zoonóticas tanto el receptor como contactos físicos cercanos, prevención de órganos o de donaciones de sangre después de recibir el tratamiento, y el establecimiento de un programa de seguimiento a largo plazo para determinar si la toxicidad tardía se produce como resultado de la terapia.

RESÚMEN DE LA INVENCION

[0015] La invención provee un método *in vitro* para crear linfocitos T activados adecuados para administrar al paciente, comprende las etapas de:

inactivación de células presentadoras de antígeno artificial (CPAAs) mediante el tratamiento de las CPAAs con un derivado de psoraleno y exponiendo las CPAA tratadas con el derivado de psoraleno a una dosis de fotoactivación de irradiación UVA; poniendo en contacto a los linfocitos T aislados de un paciente diagnosticado con una enfermedad, trastorno o condición médica con dichas CPAAs, donde antes de o concomitante con dicha etapa de contacto las CPAAs inactivadas se cargan con al menos un antígeno peptídico; y recolectando los linfocitos T.

[0016] Aquí también se describe un método para la creación de linfocitos T activados *ex vivo* para la administración a un paciente, que comprende las etapas de: inactivación de las células presentadoras de antígeno artificial (CPAAs) con un agente de reticulación de ácido nucleico; poniendo en contacto los linfocitos T aislados de un paciente diagnosticado con una enfermedad o trastorno con dichas células presentadoras de antígeno artificial inactivado; y recolectando los linfocitos T para administrar de nuevo al paciente. En un aspecto de esta realización, el agente de reticulación es un derivado de psoraleno y dicha etapa de inactivación comprende exponer el antígeno artificial que presenta las células tratadas con el derivado de psoraleno a una dosis de fotoactivación de la irradiación UVA.

[0017] Preferentemente el derivado de psoraleno utilizado en esta invención es psoraleno, 8-metoxipsoraleno (8-MOP), 4'-(aminomentil)-4,5', 8-psoraleno (AMT), o amotosalen (S59). Así mismo preferiblemente cuando el agente de reticulación es un derivado del psoraleno, la etapa de inactivación comprende la exposición del antígeno artificial de células presentadoras tratadas con derivado de psoraleno a una concentración de 1 a 100 µg/ml a la irradiación UVA a una dosis de 1 to 100 Julios/cm² de irradiación UVA por un periodo de 1 a 60 minutos.

[0018] Los métodos de esta investigación son útiles en los métodos *ex vivo* para tratar el cáncer y cánceres ejemplares contemplados dentro del alcance de esta divulgación y además estos métodos incluyen las etapas de cargar el antígeno artificial de células presentadoras con al menos un antígeno de péptido asociado al cáncer.

Además, los linfocitos T activados son preferiblemente citotóxicos hacia las células blanco que expresan el péptido, y el péptido seleccionado del grupo que consiste en antígenos peptídicos al melanoma asociados con el cáncer, antígenos peptídicos asociados con el cáncer de ovario, antígenos peptídicos asociados con el cáncer de mama, cáncer de pulmón, leucemia, mieloma múltiple, antígenos peptídicos asociados al linfoma y antígenos peptídicos asociados al cáncer de próstata. Los péptidos para el uso en los métodos descritos en este documento, son aquellos que comprenden al menos ocho aminoácidos antigénicos contiguos de la secuencia de aminoácidos de MART-1, tirosinasa, gp100, NY-ESO-1, MUC-1, CA-125, Her-2, survivina, telomerasa, CAMEL, CEA, livin, SART-1, SCP-1, SSX-2, PRAME, C-Lectin, Pec60, AES, MAGE-3, G250, FBP, SSX-4, SP17, hTRT, MUC-16, MAGE-1, Topoisomerase II, Integrin $\beta 8$ precursor de la subunidad, MUC-1, MAGE-B2, STAT 1, γ -Catenin, or H-RYK. Para la invención es preferible el uso de uno o más de los péptidos seleccionados del grupo consiste en: SILSLKEAST (SEQ ID NO.1), KMASRSMRL (SEQ ID NO.2), ALALAALLVV (SEQ ID NO.3), ALLVVDREV (SEQ ID NO. 4), YMNGTMSQV (SEQ ID NO.5), YMDGTMSQV (SEQ ID NO.6), ITDQVPFSV (SEQ ID NO.7), YLEPGPVTA (SEQ ID NO.8), AAGIGILTV (SEQ ID NO.9), ELAGIGILTV (SEQ ID NO.10), CLTSTVQLV (SEQ ID NO.11), HLYQGCQVV (SEQ ID NO.12), KIFGSLAFL (SEQ ID NO.13), IISAVVGIL (SEQ ID NO.14), PLTSIISAV (SEQ ID NO.15), VMAGVGSPYV (SEQ ID NO.16), VLVKSPNHV (SEQ ID NO.17), ELVSEFSRM (SEQ ID NO.18), YLSGANLNL (SEQ ID NO.19), GPLTLPV (SEQ ID NO.20), SLLMWITQC (SEQ ID NO.21), KALF- AGPPV (SEQ ID NO.22), YLETFREQV (SEQ ID NO.23), GLQSPKSPL (SEQ ID NO.24), VLLKLRRPV (SEQ ID NO.25), ELYIPSVDL (SEQ ID NO.26), SLLMWITQV (SEQ ID NO.27), ILAKFLHWL (SEQ ID NO.28), STAPPVHNV (SEQ ID NO.29), FLWGPRALV (SEQ ID NO.30), FMWGNLTLA (SEQ ID NO.31), RLVDDFLLV (SEQ ID NO.32), HLSTAFARV (SEQ ID NO.33), QLSLLMWIT (SEQ ID NO.34), NO.65), QLYLELSQL (SEQ ID NO.66), KVLEYVIKV (SEQ ID NO.67), KVADLVGFL (SEQ ID NO.68), KTWGQYWQV (SEQ ID NO.70) y VLDGLDVLL (SEQ ID NO.71).

[0019] Se prefiere usar una mezcla de péptidos en los métodos de la presente invención que incluyen al menos un péptido seleccionado del grupo consiste en: YMNGTMSQV (SEQ ID NO.5), ITDQVPFSV (SEQ ID NO.7), AAGIGILTV (SEQ ID NO.9), ELAGIGILTV (SEQ ID NO.10), SLLMWITQV (SEQ ID NO.27), FLWGPRALV (SEQ ID NO.30), TLAKFSPYL (PRAME; SEQ ID NO.54) y VLDGLDVLL (SEQ ID NO.71).

[0020] En un método preferido adicional de esta realización, el método comprende aislar células T de una muestra de leucoféresis (también conocido como una muestra aféresis) de un paciente para su uso en dicha etapa de contacto; y administrar al sujeto una cantidad eficaz de los linfocitos T recogidos en dicha etapa de recolección. Además, el método puede comprender también la reestimulación de dichos linfocitos T activados antes de llevar a cabo dicha etapa de administración, comprendiendo dicho procedimiento de reestimulación de esta manera: poniendo en contacto a los linfocitos T activados con al menos una citocina, promoviendo de este modo la proliferación de células T activadas; y la incubación de células T activadas con células autólogas irradiadas no-CD8+, células adherentes nonCD8+ o células presentadoras de antígenos artificiales (CAAPs) tratadas con psoraleno/UVA, generando de este modo linfocitos T activados reestimulados. Las citocinas preferidas incluyen esta selección del grupo consisten en: IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL- 17, IL-21, IFN- γ , y TNF- α , y en el que dichas células activadas linfocitos T comprenden linfocitos T citotóxicos activados.. Además los linfocitos T activados, pueden ser sometidos a al menos una iteración del procedimiento de reestimulación antes de realizar dicha etapa de generación, comprendiendo dicho procedimiento de reestimulación de esta manera: poniendo en contacto a los linfocitos T activados con una combinación de IL-2 y al menos otra de citocina seleccionada del grupo que consiste en: IL-7, IL-15 o IL-21 promoviendo de este modo el crecimiento de células T activadas, la proliferación, o diferenciación; y la incubación de las células T activadas con células autólogas irradiadas no-CD8+ , células adherentes nonCD8+ o células tratadas con las CPAA para generar de este modo linfocitos T activados reestimulados. Preferentemente el procedimiento de reestimulación comprende el contacto de los linfocitos T activados con las CPAA de *Drosophila* en presencia de IL-2 en una concentración de 1 a 100 U/ml; IL-7 de 1 a 100 U/ml, IL-15 de 1 a 100 ng/ml y IL-21 de 1 a 100 ng/ml. En un aspecto de este método , las células autólogas irradiadas adherentes no-CD8+ comprenden células autólogas irradiadas adherentes CD14+ y en otro aspecto de la etapa de generación, dicho procedimiento de reestimulación comprende: poner en contacto a los linfocitos T activados con una combinación de IL-2 y al menos otra de citocina seleccionada del grupo, que consiste en: IL-7, IL-15 o IL-21 promoviendo de este modo el crecimiento de células T activadas, la proliferación, o diferenciación; y la incubación de las células T activadas con células autólogas irradiadas no-CD8+, células adherentes nonCD8+ o células con los CPAA tratadas con psoraleno/UVA para generar de este modo linfocitos T activados reestimulados. Preferentemente el procedimiento de reestimulación comprende el contacto de los linfocitos T activados con los CPAA de *Drosophila* en presencia de IL-2 en una concentración de 1 a 100 U/ml; IL-7 de 1 a 100 U/ml, IL-15 de 1 a 100 ng/ml y IL-21 de 1 a 100 ng/ml. En un aspecto de este método, las células autólogas irradiadas adherentes nonCD8+ comprenden células autólogas irradiadas adherentes CD14+ y en otro aspecto de esta realización, las células autólogas irradiadas no-CD8+ comprenden células T autólogas irradiadas CD14+.

[0021] En otro aspecto de este método, este comprende además, la congelación y descongelación de dichas células presentadoras de antígeno artificial antes, después o concomitante con dicha etapa de inactivación y antes de dicha etapa de contacto. Preferentemente, en todos los aspectos de estos métodos, la inactivación de células presentadoras de antígeno artificial son incapaces de proliferarse y están esencialmente libres de contaminación.

[0022] En los métodos preferidos de esta invención las células presentadoras de antígeno artificial expresan un leucocito humano CMH molécula de antígeno humano, β -2 microglobulina y una molécula auxiliar que comprende

una molécula co-estimuladora humana seleccionada del grupo que consiste en CD80 (B7-1), LFA-3 (CD58), CD83, CD86 (B7-2) o un miembro de la familia de TNF seleccionado de entre el grupo que consiste en CD70, TNF, LT, 4-1BBL y OX40L o una molécula de adhesión seleccionada del grupo que consiste de ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 y LFA-3. Aún más preferiblemente las células presentadoras de antígenos artificiales expresan el HLA humana clase I antígeno CMH molécula HLA 2.1. Donde la molécula CMH de clase I es HLA-A2.1, las moléculas auxiliares son preferiblemente B7-1 (CD80), LFA-3 (CD58), CD70 y ICAM-1 (CD54). Preferiblemente también, las células presentadoras de antígeno artificial son tratadas con psoralen/UVA células *Drosophila* transfectadas con moléculas de HLA y moléculas coestimuladoras.

[0023] Como se mencionó anteriormente, un uso preferido de este método se refiere a una variedad de cánceres, incluyendo melanoma maligno, mieloma múltiple, cáncer de próstata, linfoma, linfoma no-Hodgkin, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, linfoma de Burkitt, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, glioma, y cáncer de cerebro.

[0024] Otro aspecto de esta realización en este invento, se refiere a las células presentadoras de antígeno artificial de *Drosophila*. La invención provee células presentadoras de antígeno artificial de las CPAA inactivadas de (*Drosophila* aAPCs) con ácido nucleico reticulado, en el que las CPAA de *Drosophila* están inactivadas por un tratamiento de derivado de psoraleno y expuestas a una dosis de fotoactivación de irradiación UVA, en donde las CPAA inactivadas de *Drosophila* pueden activar a los linfocitos T cuando las CPAA inactivadas se cargan con uno o más antígenos péptidos antes o concomitantes con la activación de linfocitos T.

[0025] Las células presentadoras de antígeno artificial de psoraleno inactivado preferidas son las que expresan HLA-A2.1, B7-1 (CD80), LFA-3(CD58), CD70 y la proteína ICAM-1(CD54) de superficie celular. Un conjunto de mezcla de péptidos preferido para ser combinado con las células presentadoras de antígeno artificial incluye: YMNGTMSQV (SEQ ID NO.5), ITDQVPFSV (SEQ ID NO.7), AAGIGILTV (SEQ ID NO.9), ELAGIGILTV (SEQ ID NO.10), SLLMWITQV (SEQ ID NO.27), FLWGPRLV (SEQ ID NO.30), TLAKFSPYL (PRAME; SEQ ID NO.54) y VLDGLDVLL (SEQ ID NO.71). Cuando se combinan con las células presentadoras de antígeno artificial, estos péptidos se asocian con las proteínas CMH y se dice que están "cargadas", antígeno artificial de células presentadoras las cuales presentan después la combinación preferida de péptido. Otras células presentadoras de antígenos artificiales incluyen aquellas que expresan las proteínas de superficie HLA-A2.1, B7-1 y ICAM-1. Otras células presentadoras de antígenos artificiales incluyen células que expresan HLA-A2.1, B&-1, FLA-3, CD70 y ICAM-1;aquellas que expresan HLA-A2.1, B&-1, B&-2, FLA-3 y ICAM-1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS CUADROS

[0027]

Figura 1 ilustra los títulos de baculovirus tras el tratamiento UVADEX/UV de las células Sf9 infectadas con baculovirus. Las células Sf9 se infectaron con una dosis titulada de baculovirus, y las células infectadas se trataron con 5m g/ml de UVADEX a 4°C durante 30 minutos, seguido de tratamiento UVA por 0, 2, 10, o 20 minutos, respectivamente, como se indica. Las células tratadas fueron cultivadas a 28°C durante 4 días. Se recogió sobrenadante del cultivo y se utilizó para infectar cultivos frescos, cultivos no infectados de células Sf9 sembradas en placas de 96 pocillos. Baculovirus presentes en estos cultivos Sf9 fueron detectados mediante un ensayo rápido de microtitulación (Invitrogen) usando un anticuerpo de gp64 específico, y se calcularon los títulos de baculovirus.

La Figura 2 ilustra un análisis de la proliferación celular de las CPA (xAPCs) xenogénicas no tratadas versus las xCPA de *Drosophila* tratada con UVADEX/UVA. Las xCPA de *Drosophila* no se trataron o se trataron con UVADEX (5µg/ml) a 4°C durante 30 minutos, seguido de un tratamiento UVA por 0, 2, 10, o 20 minutos, respectivamente, como se indica. Las células tratadas fueron lavadas completamente para remover el residuo UVADEX y después sembradas en placas de 6 pocillos a 1 x 10⁶ células/ml y cultivadas de forma continua durante 16 días. Las xCPAs viables (es decir, en vivo) se contaron en el día 1, día 5, día 9, día 14, y el día 16 post-tratamiento mediante tinción con azul de tripano en cada cultivo.

La Figura 3 muestra un análisis del grado de transcripción del ácido nucleico xenogénico asociado con *Drosophila* CPAA (clon B) que se dejaron sin tratar, γ-irradiación tratada, o UVADEX/UVA tratada. Cultivos de las xCPA de *Drosophila* (clon B) se dejaron sin tratar, se trataron con γ-Irradiación durante 50 minutos (entrega de aproximadamente 16.000 rads), o tratados con UVADEX (5µg/ml)/UVA. Cada cultivo de las xCPA se lavó y se cocultivó durante 10 semanas con una línea celular de alimentación de *Drosophila* (clon D) que no contenía ácido nucleico xenogénico codificado HLA A2.1, B7-1, B7-2, y β2m. La transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizó cebadores específicos de reacciones para HLA A2.1, B7-1, B7-2, y transcripciones β2m después fueron realizadas en los extractos de las líneas celulares del indicador que se cocultivaron con cada uno de los no tratados, UVADEX (5µg/ml)/UVA-tratada, y las xAPC γirradiadas. Los productos de RT-PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa. Carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, los productos de RT-PCR de

las xAPC clon B no tratada (control positivo); carril 3, productos de RT-PCR de las xCPA clon B γ -irradiada; carriles 4, 5 y 6, los productos de RT-PCR de UVADEX-tratado las xAPC clon B en donde fueron irradiados rayos UVA durante 5, 15 o 30 minutos, respectivamente, como se indica.

5 Las figuras 4A a 4C muestran un análisis de la infectividad del virus lítico y la actividad microbiana asociada con las xCPA de *Drosophila* y ácido nucleico xenogénico asociado que estaban sin tratar o fueron sometidos a un tratamiento UVADEX/UVA. (Figura 4A, análisis de microscopía de lisis de células indicadoras clon D incubadas con una alícuota de reserva viral xAPC sin tratar; Figura 4B, análisis de microscopía de lisis de células indicadoras clon D incubadas con una alícuota de UVADEX/UVA-tratada de suministro viral xCPA; Figura 4C, análisis de la supervivencia celular de células indicadoras clon D incubadas con las diluciones seriadas indicadas de suministro viral xCPA no tratada o de suministro viral xCPA de UVADEX/UVA. Círculos cerrados, células incubadas con el clon D reserva viral no tratada; círculos abiertos, células clonadas incubadas con UVADEX/UVA reserva viral tratada.

15 La Figura 5 muestra un análisis de FACS (citómetros) de la expresión de superficie de moléculas exógenas en células de *Drosophila* xAPC/*Drosophila* cocultivos indicador clon D, que se dejaron sin tratar, se trató con γ -irradiación tratada o UVADEX/UVA-tratada. El análisis de FACS se llevó a cabo de forma independiente usando anticuerpos específicos para HLA humano, B7.1 humano, y ICAM-1, como se indica.

20 La Figura 6 muestra un análisis de FACS de la expresión de superficie de moléculas exógenas en no tratado y UVADEX-tratado xAPC de *Drosophila* que fueron expuestos a 5 o 15 minutos de UVA, como se indica. El análisis de FACS se llevó a cabo de forma independiente usando anticuerpos específicos para HLA humano, B7.1 humano, y ICAM-1, como se indica.

25 La Figura 7 muestra la generación de MART-1 con los CTL específicos sin tratamiento, UVADEX/UVA-tratado, o UVADEX/UVA más congelación-descongelación de las xCPA tratadas. Círculos sólidos, no tratados; círculos abiertos, UVADEX/UVA; triángulos abiertos, UVA-DEX/UVA más congelación-descongelación tratada.

30 Las figuras 8A y 8B muestran la mejoría dependiente de MYD88 de la activación de los CTL de antígeno específico por UVADEX/UVA-tratados en comparación con las xCPA no tratadas. La Figura 8A muestra una comparación del porcentaje de células T CD8+ aisladas de ratones C57BL/6 (tipo silvestre) que fueron teñidos con el péptido OVA8 (SIINFEKL; SEQ ID NO.70)-unido CMH tetrámeros después de la activación, ya sea con UVADEX/UVA-tratada xAPCs expresando Kb, B7-1, y de ICAM-1 moléculas cargadas con el péptido OVA8 o xAPC no tratadas expresando las mismas moléculas (carril 2 vs. carril 1). Figura 8B muestra una comparación del porcentaje de células T CD8+ aisladas de MyD88 ratones (MyD88 -/-) knock-out que fueron teñidos con el péptido OVA8 (SIINFEKL; SEQ ID NO.70)-unido tetrámeros CMH después de la activación, ya sea con las xCPA UVADEX/UVA-tratadas o con las xCPA no tratadas (carril 4 vs. carril 3) tal como se describe para la Figura 8A. Los carriles 1 y 2, porcentaje de células teñidas T CD8+ de forma aislada y activadas de ratones de tipo salvaje (B6), como se describe en la Figura 8A (realizado como un control positivo).

40 Las Figuras 9A-9F proporcionan un diagrama de flujo que describe los pasos de la realización especialmente preferida del método de terapia de células de acuerdo con la divulgación.

45 La Figura 10 muestra el análisis de FACS de la expresión de la superficie de moléculas exógenas en los xAPC de *Drosophila* (1120) que se transfectan con HLA-A2, B7-1, ICAM-1, LFA-3 y CD70 antes y después del tratamiento de psoraleno/UVA. Las xCPA de *Drosophila* fueron cultivadas con CuSO₄ (1 mM) durante 48 horas a temperatura ambiente para inducir la expresión de moléculas exógenas. Las xCPA inducidas de *Drosophila* primero fueron cultivadas con UVADEX (5ug/ml durante 30 min a 4°C) y luego fueron expuestas a UVA durante 10 minutos. Las células fueron lavadas extensamente por medio de cultivo y se tiñeron con anticuerpos específicos humano HLA-ABC, B7-1, ICAM-1, LFA-3 y CD 70, respectivamente, y se analizaron con un escáner de FACS.

55 Figura 11 muestra la comparación de las actividades de CTL *ex vivo* generados de los CTL específicos de melanoma reestimuladas con las xCPA de *Drosophila* tratadas con psoraleno (FFF) o con células adherentes no CD8 de PBMC del mismo donante (FAA). Células humanas purificadas CD8 T de donantes HLA-A2 positivos fueron cultivados con las xCPA de *Drosophila* psoraleno/UVA tratado precargado con una mezcla de 6 péptidos de melanoma (689, 792, 817, 818, 819, 853) a 37°C. Al día 4 se añadieron IL-2 humana (20U/ml) y IL-7 (30U/ml). Las células T CD8 activadas fueron reestimuladas dos veces en el día 6 y el día 14, ya sea con células adherentes no CD8 de PBMC del mismo donante (FAA) o con psoraleno/UVA tratado de las CPA de *Drosophila* (FFF) en presencia de péptidos antigénicos anteriores con un péptido adicional 952 (mMART-1). Las células T CD8 de antígeno específico fueron evaluadas mediante el ensayo de 51Cr. En resumen, las células M14 etiquetadas 51Cr o células T2 cargadas con péptido fueron utilizadas como blancos y los CTL fueron añadidos a 0,4, 2,10, 50 ratio efector/blanco. El sobrenadante fue recogido 4 horas después del cultivo y el 51Cr liberado de los blancos fue medido con un γ -contador.

65 La Figura 12 muestra la comparación de la potencia de CTL (expansión x de unidades líticas) de *ex vivo* de

los CTL específicos de melanoma generados reestimuladas de las xCPA de *Drosophila* con psoraleno-tratado (FFF) o con células adherentes no CD8 de PBMC (FAA). Células humanas purificadas CD8 T de donantes HLA-A2 positivos primero fueron cultivadas con las CPA de *Drosophila* tratado con psoraleno/UVA fueron precargadas con una mezcla de 6 péptidos de melanoma a 37 °C. Al día 4, se añadieron IL-2 humana (20U/ml) y IL-7 (30U/ml). Las células T CD8 activadas fueron reestimuladas dos veces en el día 6 y el día 14, ya sea con células adherentes no CD8 en PBMC del mismo donante (FAA) o las CPA de *Drosophila* (FFF) en presencia de péptidos antigénicos. En el día 22 los CTL fueron recolectados y fue calculado el pliegue de expansión de las células T CD8. Las células T CD8 de antígeno específico fueron evaluadas mediante el ensayo de 51Cr. En resumen, las células M14 etiquetadas 51Cr (línea celular de melanoma) o células T2 cargadas con péptido fueron utilizadas como blancos. Las unidades líticas (LU) fueron calculadas por 100 divididas entre el ratio E/T en el que hay 30% de lisis, y la potencia fue calculada multiplicando LU y pliegue de expansión.

La figura 13 muestra el análisis de FACS de los CTL específicos de antígeno con tetrámero HLA-A2/Mart-1. Células humanas purificadas CD8 T de donantes HLA-A2 positivos primero fueron cultivadas con las xCPA de *Drosophila* tratado con psoraleno/UVA precargadas con una mezcla de 6 péptidos de melanoma a 37 °C (F). En el día 4, se añadieron IL-2 humana (20u/ml) y IL-7 (30u/ml). Las células T CD8 fueron reestimuladas el día 6 y el día 14, ya sea con las xCPA de *Drosophila* tratado con psoraleno/UVA una (FF) o dos veces (FFF) con células adherentes no CD8 de PBMC del mismo donante una (FA) o dos veces (FAA.) Las células T CD8 de antígeno específico fueron evaluadas tiñiendo las células con anticuerpos anti-CD8 (X-axis) y Mart-1/A2 tetrámero (Y-axis) y analizadas por un FACScanto.

La Figura 14 muestra la comparación de fenotipos de los CTL de las células específicas generadas ex vivo de las xCPA de *Drosophila* en presencia de la combinación de diferentes citoquinas. Células humanas purificadas CD8 T de donantes HLA-A2 positivos fueron cultivadas con las xCPA de *Drosophila* psoraleno/UVA tratado precargado con una mezcla de 6 péptidos de melanoma (689, 4, 817, 818, 819, 853) a 37°C. En el día 4 se añadieron IL-7humana (30U/ml) más IL-2 (20U/ml), o IL-7, IL-2 más IL-15 (25ng/ml) o IL-7, IL-2 más IL-21 (25ng/ml) or IL-7, IL-15 plus IL-21. Las células T CD8 activadas fueron reestimuladas dos veces en el día 6 y en el día 14, con las CPA (FFF) en presencia de péptidos antigénicos y citoquinas indicadas. Los CTL de antígeno específico y los marcadores de la superficie de células T CD8 fueron evaluados por tinción de las células con anticuerpos anti-CD8 y tetrámeros o anticuerpos indicados. Los datos fueron analizados por un FACScanto. Los valores mostrados ha sido la media de los datos de dos donantes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION Y SUS FORMAS DE REALIZACION PREFERIDAS

[0028] Los términos "incluyendo" , "comprende" y "contiene" se utilizan en este documento en su sentido abierto, no limitante.

[0029] De acuerdo con un aspecto general de la presente invención, las células presentadoras de antígeno artificial (aAPC) se exponen a un agente de reticulación de derivado de psoraleno, haciendo de ese modo a las CPAA no viables. Preferentemente, las CPAA también se presentan esencialmente libres de microorganismos contaminantes mediante la inactivación a través de la reticulación. Tales CPAAs inactivadas, cuando están cargadas con el péptido seleccionado, todavía son capaces de activar las células T naive para convertirse en células T activadas (por ejemplo, ya sea en racimo o de diferenciación las células (CD) T CD4+ T o las células T CD8+ activadas, que son células T auxiliares activadas o los CTL, específicos respectivamente) para el péptido seleccionado. Las CPAA inactivados son útiles en la preparación de composiciones terapéuticas y en los productos de terapia celular que contienen células T activadas que se han generado por el contacto de las CPAA inactivadas cargadas con péptido. Para una guía general en cuanto a la preparación de sistemas que presentan antígenos, incluyendo los basados en especies xenogénicos, véase p.ej. U.S. Patente No. 5,962,320; U.S. solicitud de patente Números de publicación 2003/0072796, 2003/0077248, 2004/0071671, 2005/0152916, y 2006/0134125; .Publicación Internacional N° WO 00/63690, WO 02/065992 y WO 02/092773; Oelke et al., Trends in Molecular Medicine, vol. 11 (9), pp 412-420 (2005).; Sun et al., Immunity, vol. 4, pp 555-564 (1996); y Kim et al., Nature Biotechnology, Vol. 22 (4), pp. 403-410 (2004).

[0030] El linaje específico de células T naive que es activado por las CPA desactivadas depende de la naturaleza de las moléculas de CMH que se expresan en la superficie de las CPAA. En consecuencia, las CPAA que se expresan sólo en las moléculas CMH de clase I pueden presentar un péptido seleccionado y activar las células T CD8+ naive, y las CPAA que expresan moléculas CMH de clase II pueden presentar un péptido seleccionado y activar las células T CD4+ naive. Del mismo modo, las CPAA que expresan moléculas de CMH de clase I tanto como CMH de clase II pueden presentar un péptido seleccionado y activar ambas células naive T CD8+ y T CD4+.

[0031] De acuerdo con la divulgación, para elaborar un producto de terapia celular, las células T naive autólogas obtenidas a partir de una muestra aféresis retirada de un sujeto, se ponen en contacto con las CPAA inactivadas que han sido cargados con el péptido seleccionado, como un péptido que contenga al menos ocho aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de una proteína de AML humano. Como resultado, las células T naive

en contacto se vuelven activas, cuando están preparadas para dirigirse a las células que expresan al menos un epítipo que corresponde al péptido seleccionado con el fueron activadas las células T naive. Cuando se encuentran las células T activadas con las células blanco, estas pueden ser eliminadas por las células T activadas, eso se debe a la capacidad de exposición de citotoxicidad de las células T activadas (es decir, la muerte celular específica).

[0032] La muestra de aféresis puede ser recogida del sujeto, mediante cualquier serie de procedimientos adecuados: aféresis de linfocitos, aféresis de linfa y aféresis de linfa conocidos actualmente o en la técnica que esté disponible, la cual prevee la recolección de los leucocitos de sangre periférica (PBL) a partir de la sangre periférica extraída, y de la cual se pueden separar los leucocitos de otros componentes del plasma de la muestra. Los modelos de los procedimientos se ilustran p. ej. en: U.S. solicitud de patente números US 2004/0173778 y US 200/40147021, y U.S. Patent Nos. 4,690,915, 5,126,132, 6,255,073, 5,846,827, 6,251,385, 6,225,044, 6,210,963, 6,194,207, 5,443,983, 6,040,177, 5,766,920, 6,210,662, 6,204,058, y 6,227,368. De la muestra de aféresis, las células T naive, las cuales pueden ser células T naive CD4+, células T naive CD8+, o células T naive CD4+ y células T naive CD8+, están separadas sustancialmente de otros PBL, por ejemplo, las células no-T. Preferiblemente, las células T naive CD8+ se separan y luego se emplean para producir una composición terapéutica o un producto de terapia celular que contiene células T citotóxicas autólogas (CTL), cuyo producto es adecuado para ser reinfundidas o transfundidas de nuevo en el sujeto de quien fue la muestra de aféresis utilizada para derivar el producto de terapia celular que se obtuvo. Los procedimientos de reinfusión que pueden ser empleados incluyen aquellos procedimientos descritos p. ej. en: U.S. Patent Nos. 4,844,893 and 4,690,915.

[0033] Un sujeto del que se puede obtener un producto de aféresis que contenga células T naive es preferiblemente un mamífero en necesidad de tratamiento, tal como un perro, un gato, un caballo, una rata, conejo, ratón, un primate no humano, o un ser humano. Más preferiblemente, el sujeto es un paciente humano en necesidad de tratamiento para una enfermedad, trastorno o condición médica asociada con la función del sistema inmune anormal. Otra alternativa, en circunstancias apropiadas células inmunes, tales como células T naive, que no se deriven de un sujeto a tratar, pero que se deriven de otra fuente compatible, ya sea de un donante de célula inmune, o incluso de una línea celular inmune inmortalizada o transformada, estas pueden emplearse para preparar productos de terapia celular de acuerdo con la invención.

[0034] Los métodos para la selección de los PBL incluyen procedimientos que emplean gradientes de Ficoll, técnica que emplea inmunopurificación (por ejemplo, anticuerpos monoclonales dirigidos contra los marcadores de superficie celular, tales como las moléculas de CD, y las cuentas, tales como Sefarosa-, proteína-A, y la proteína-G cuentas combinadas en los que los anticuerpos pueden ser adsorbidos, y cuentas magnéticas en los que los anticuerpos pueden ser adsorbidos), citometría de flujo, y el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0035] Preferentemente las células T naive seleccionadas son sustancialmente separadas de los componentes no seleccionados de la muestra de aféresis. Más preferiblemente, las células T naive seleccionadas son sustancialmente purificadas por sistemas de purificación de cuentas magnéticas tales como los disponibles en la técnica, por ejemplo, cuentas Miltenyi (Miltenyi Biotec) y sistemas de Dynabead (Dynal Biotech) combinados con los procedimientos de clasificación de células, tales como los métodos basados en FACS, u otros dispositivos y metodologías de clasificación de células apropiadas. De este modo las células T naive seleccionadas luego se mezclan y se incuban con un péptido-inactivado y seleccionado cargado a las CPAA durante un tiempo suficiente para activar y enriquecer a una población deseada de células T activadas, tales como células T auxiliares activadas, preferiblemente a las células T naive CD8+ o a los CTL. Tales células T activadas se activan preferiblemente en una manera específica de péptido.

[0036] La proporción sustancialmente separada de las células T naive a las CPAA puede ser optimizado para el individuo particular, por ejemplo, a la luz de las características individuales como la docilidad de los linfocitos del individuo, a las condiciones de cultivo, a la naturaleza y gravedad de la enfermedad u otra condición que esté siendo tratada. Un ejemplo de células T naive separadas a la proporción de las CPAA inactivados es de aproximadamente 30: 1 a 300: 1. Por ejemplo, 3×10^7 PBL humana y 1×10^6 aAPCs pueden ser incorporados y mantenidos en la media que comprende RPMI 1640 el medio de cultivo.

[0037] Por lo tanto, las células T naive que contienen CD4+ o CD8+ no han sido preparadas con el péptido-cargado de las CPAA seleccionado. Las células T naive se pueden identificar experimentalmente basadas en una o más características adecuadas seleccionadas de forma rutinaria, como aquellas asociadas con el crecimiento celular y el estado de proliferación, fenotipo de células, y actividad celular. Con respecto al crecimiento celular y al estado de proliferación, las células T naive preferiblemente contienen una población de células T en reposo, es decir, tienden a residir en la porción G0 del ciclo celular. Las células T activadas están a menudo en la fase G1 o S del ciclo celular. Las células T de memoria comprenden las células T que alguna vez fueron naive pero se han activado y posteriormente ha vuelto a entrar en un estado de reposo, o comprenden células T naive que adquirieron un fenotipo de memoria como resultado de la expansión homeostática (véase Opferman et al., Science, Vol. 283, pp. 1745-1748 (1999); Wherry et al., Nat. Immunol., Vol. 4, pp. 225-234 (2003); Kaech et al., Cell, 15

Vol.111, pp. 837-851 (2002); Kieper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96, pp. 13306-13311 (1999); Goldrath et al., J. Exp. Med., Vol. 192, pp. 557-564 (2000); Murali-Krishna et al., J. Immunol., Vol. 165, pp. 1733-1737 (2000)). Por ejemplo tales células T de memoria pueden ser reactivadas tras la re-exposición al antígeno de cebado, la asistencia de células T auxiliares CD4+, y/o la exposición a citocinas apropiadas. Por lo tanto, en comparación con las células T de memoria y T activadas, las células T naive son relativamente *no-proliferativas in vivo*, a menos que la disminución de la reserva de células T naive (como ocurre durante una fuerte activación de las células T en respuesta al antígeno) requiere un período de proliferación homeostática relativamente lenta a fin de reponer el número de células T naive (véase p. ej. Kieper et al., J. Immunol., Vol. 174, pp. 3157-3.163 (2005), y Baccala et al., J. Immunol., Vol. 174, pp. 4606-4612 (2005)). Con respecto al fenotipo, las células T naive pueden distinguirse de las células T no-naive (por ejemplo, las células T auxiliares CD4+, células T de memoria, y las células T efectoras (por ejemplo, los CTL)) por la existencia y el nivel relativo de expresión del perfil molecular de CD asociado a la célula T naive, que puede incluir CD11a^{low}/LFA-1^{low} (o dim), CD25^{low}, CD27⁺ (o hi), CD44^{low} or CD44^{int}, CD45RA⁺ (o pos), CD45RO⁻ (o neg), CD95^{low} (o dim), CD57⁻ (o neg), y CD62L^{hi} (o bright), en comparación con el nivel de expresión observado para células T no naive. Las células T naive también pueden distinguirse por un alto nivel de expresión relativo del receptor de quimioquinas, CCR7 (CCR7^{hi}) en comparación con el nivel de expresión observado para células T no-naive (véase p. ej. McFarland et al., PNAS, Vol. 97(8), pp. 4215-4220 (2000); Ishimaru et al., Nature Immunol., Vol. 7(7), pp. 763-772 (2006); y Kern et al., Eur. J. Immunol., Vol. 29, pp. 2908-2915 (1999)). En contraste, las células de memoria, por ejemplo, pueden caracterizarse por un fenotipo CD27^{low}, CD44^{hi}, CD45RA⁻, CD45RO⁺, CD57⁺ (o hi), CD62L^{low}, y/o CCR7^{low} (véase p. ej.: Kern et al., Eur. J. Immunol., Vol. 29, pp. 2908-2915 (1999), y Baccala et al., J. Immunol., Vol. 174:4606-4612 (2005)). Con respecto a la actividad celular, las células T naive pueden caracterizarse por una incapacidad para producir de manera eficiente o secretar interferón alfa, interferón gamma, interleucina (IL)1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), y/o de factor estimulante GM-CSF de granulocitos y colonia de macrófagos (véase p. ej. Cerwenka et al., J. Immunol., Vol., 161, pp. 97-105 (1998); Walzer et al., Cell. Immunol., Vol. 206, pp. 16-25 (2000); Tizard, I., IMMUNOLOGY: AN INTRODUCTION, 3rd Edition, pp. 129-143 (1992); U.S. Patent Application Publication No. US 2002/0119121; and International Publication No. WO 2002/022648) Las células T naive no presentan también citotoxicidad sustantiva o actividad específica de destrucción celular frente a las presuntas células diana.

[0038] Las células T naive, que pueden contener células naive T CD8+, células T naive CD4+, o combinaciones de células T CD8+ células T CD4+ que están preparadas y estimuladas, y por lo tanto activadas, como se ha descrito anteriormente, opcionalmente pueden ser restimuladas y/o expandidas para producir composiciones terapéuticas y productos de terapia celular conteniendo células T activadas del fenotipo y número deseado. Los modelos de los procedimientos de reestimulación incluyen la adición de una o más citocinas seleccionadas que promueven el crecimiento de células T activadas, la proliferación y/o la diferenciación y las células T activadas incubadas con células nonCD8+ cargadas con péptido seleccionado, tales como células CD14+. La selección de las citocinas adecuadas dependerá del fenotipo deseado de las células T activadas que en última instancia contienen la composición terapéutica o el producto de terapia celular. Por lo tanto, las células T CD4+ naive pueden ser activadas y opcionalmente ser restimuladas y/o expandidas para convertirse en células T auxiliares CD4+ (Th)1 o en las células CD4+ Th2, y las células T naive CD8+ pueden ser activadas y opcionalmente restimuladas y/o expandidas para convertirse en CTLs que poseen un fenotipo Tc1, CTLs que poseen un fenotipo Tc2 similar, las células T de memoria, o una combinación de los mismos, según lo deseado por el artesano teniendo en cuenta la orientación en la técnica (véase p. ej. Cerwenka et al., J. Immunol., Vol. 163(10), pp. 5535-5543 (1999); Mosmann et al., Immunol. Today, Vol. 17(3), pp. 138-146 (1996); Carter et al., Curr. Opin. Immunol., Vol. 8(3), pp. 336-342 (1996); Croft et al., J. Exp. Med., Vol. 180, pp. 1715-1728 (1994); Fujihashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 3613-3618 (1996); U.S. Patent No. 6,355,479 and International Publication No. WO 97/46256. Citocinas preferidas incluidas IL-1, IL-2, IL-7, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IFN- γ , y TNF- α . Un modelo de los procedimientos de expansión de las células T incluye la incubación de células T activadas con células irradiadas no-CD8+ en presencia de citocinas seleccionadas y una preparación de anticuerpos anti-CD3, tal como OKT@3, para promover la expansión de células T activadas no- específicas. La selección del número, la secuencia y combinación de tales protocolos de estimulación y expansión para ser empleados están dentro del ámbito del experto y puede ser facilitado por la orientación en la técnica. Véase p. ej. Cerwenka et al., J. Immunol., Vol., 161, pp. 97-105 (1998); Livingston et al., Immunol. Invest., Vol. 24(4), pp. 619-629 (1995); Sad et al., Immunity, Vol. 2, pp. 271-279 (1995); U.S. Patent Application Publication No. US 2003/0170212; and International Publication No. WO 02/092773.

[0039] En realizaciones preferidas, las células T que han sido estimuladas se someten posteriormente a al menos una iteración de un procedimiento de re-estimulación, que comprende poner en contacto a las células T estimuladas con cantidades de IL-2 e IL-7 suficientes para promover el crecimiento, la proliferación y/o la diferenciación de células T activas, y después la incubación de células T en contacto con células no-CD8+ adherentes autólogas irradiadas, (por ejemplo, células CD14+) y cantidades suficientes adicionales de IL-2 e IL-7. En realizaciones en las que el procedimiento de reestimulación se realiza más de una vez, las células T activadas se ponen en contacto con cantidades adicionales de IL-2 e IL-7 entre cada iteración del procedimiento de reestimulación. En otras realizaciones preferidas, las células T activadas se someten a al menos un procedimiento de expansión posterior a al menos una iteración de un procedimiento de reestimulación, en el que el procedimiento

de expansión comprende la incubación de células T activadas con células nonCD8+ irradiadas en presencia de una cantidad de IL-2 suficiente para promover el crecimiento, la proliferación y/o la diferenciación de las células T contactadas, y una preparación de anticuerpos anti-CD3, de preferencia OKT@3.

5 **[0040]** En realizaciones preferidas, las células T naive contienen células T CD8+, que cuando se activan y
 opcionalmente se re-estimulan y/o amplian, pueden presentar, por ejemplo, actividad citotóxica frente a las células
 a los que van dirigidas o producen citocinas inmuoestimulantes o citotoxicidad asociada. Preferiblemente,
 presentan una combinación de estas características. Las células T CD8+ naive que han sido cebadas y activadas
 10 pueden ser sometidas a los protocolos de re-estimulación y/o de expansión como se describe anteriormente, las
 cuales conducen la diferenciación y/o la polarización de las células T CD8+ en activación hacia los fenotipos de
 linaje celular del CTL específico, tales como CD8+ Tc1 y a los fenotipos CD8+ TC2. Las células T CD8+ cargadas
 con péptido aAPC-activado también pueden ser sometidas a varias rondas de *re-estimulación, in vivo o in vitro*,
 solo con el péptido seleccionado o en conjunto con ciertas citocinas, tales como IL-2, IL-7, IL- y 12, y el interferón
 15 gamma o con anticuerpos, tales como aquellos dirigidos contra el receptor (TCR) de célula T y las moléculas
 coestimuladoras en la superficie de las células T activadas. En realizaciones preferidas, de esta manera las células
 T CD8+ activadas se volvieron a re-estimular aún más, lo que mantiene la inmunogenicidad y la citotoxicidad de las
 células blanco durante al menos aproximadamente cuatro o cinco generaciones, produciendo células T de memoria
 CD8+. Los métodos para la identificación, caracterización, mantenimiento de inmunogenicidad, y la expansión de
 las células T de memoria CD8+ se pueden encontrar, por ejemplo en: Cerwenka et al., J. Immunol., Vol., 161, pp.
 20 97-105 (1998); Cerwenka et al., J. Immunol., Vol. 163, pp. 5535-5543 (1999); Patent Application Publication No.
 2002/0119121; and International Publication No. WO 2002/022648.

[0041] Las CPAA que se emplean en los métodos de preparación de productos de terapia celular pueden contener
 las xCPA inactivadas, que modifican a las células huésped de una especie no humana que son capaces de
 25 expresar moléculas exógenas en su superficie, y medio de cultivo xCPA. Las CPAA también contienen una
 molécula de CMH exógeno seleccionado de moléculas de CMH de clase I y moléculas de CMH de clase II. Los
 sistemas de las CPAA además contienen opcionalmente al menos una molécula exógena auxiliar que ayuda a la
 activación de las células T naive. Las moléculas exógenas de preferencia son codificadas por el ácido nucleico
 xenogénico que se ha introducido en las células huésped.

[0042] Las CPAA de preferencia contienen al menos una molécula coestimuladora sumado a la molécula de CMH
 de clase I o a la molécula CMH de clase II. Preferiblemente las CPAA contienen al menos una molécula
 coestimuladora y al menos una molécula de adhesión sumado a la molécula de CMH de clase I o a la molécula
 CMH de clase II (véase Kim et al., 2004, Nature, Vol. 22(4), pp.403-410; Cai et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci.
 35 USA, Vol. 93, pp. 14736-14741; Jackson et al., 1992, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 12117-12121;
 Schoenberger et al., 1998, Cancer Res., Vol. 58, pp. 3094-3100; and Latouche et al., 2000, Nat. Biotechnol., Vol.
 18, pp. 405-409). Las técnicas, métodos y reactivos útiles para la selección, la clonación, la preparación y la
 expresión de moléculas auxiliares a modo de ejemplo, incluyendo moléculas coestimuladoras y moléculas de
 adhesión, se ejemplifican p. ej. en: U.S. Patent Nos. 6,225,042, 6,355,479, and 6,362,001. Molécula de antígeno
 40 preferida CMH clase I HLA, pero no se limitan a HLA 2.1 (HLA-A*0201), así como HLA-A*0101, HLA-A*0301, HLA-
 A*1101, HLA-A*2402, HLA-A*3303, HLA-C*0701, HLA-C*0702, HLA-C*0401, HLA-B*0702, HLA-B*4402, HLA-
 B*3501.

[0043] Las Moléculas CMH clase I preferidas incluyen una cadena pesada (ejemplo: cadena alfa) y una β -
 45 microglobulina. Tal molécula de CMH de clase I puede ser una molécula de extensión completa o una porción
 extracelular de una molécula de extensión completa, tal porción extracelular carece de transmembrana completa o
 dominios citoplásmicos, o carece tanto de transmembrana completa como de dominios citoplásmicos. La molécula
 de CMH de clase I preferiblemente es capaz de unirse a un péptido seleccionado. Los modelos de moléculas CMH
 de clase I que se pueden emplear en la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas que están codificadas
 50 por el antígeno de leucocitos humanos (HLA)-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, or HLA-G loci. De preferencia,
 la molécula de CMH clase I se selecciona a partir de moléculas codificadas por HLA-A, HLA-B, and HLA-C loci.
 Técnicas, métodos y reactivos útiles para la selección, la clonación, la preparación y la expresión de moléculas de
 β 2-microglobulina, moléculas de CMH de clase I, tales como moléculas de HLA, y porciones de los mismos, se
 ejemplifican en U.S. Patent Nos. 6,225,042,6,355,479, and 6,362,001.

[0044] Las moléculas CMH de clase II preferidas incluyen una cadena alfa (α) y una cadena beta (β) que se
 asocian entre sí para formar un heterodímero CMH de clase II. Tal heterodímero CMH de clase II puede ser una
 molécula de extensión completa o una porción extracelular de una cadena de extensión α completa, una porción
 extracelular de una cadena de extensión β completa, o porciones extracelulares de ambas α y cadenas P, tal
 60 porción extracelular o porciones completas carecen de transmembrana o dominios citoplásmicos. Los modelos de
 moléculas CMH de clase II que se pueden emplear en la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas que
 están codificadas por HLA-DP, HLA-DQ HLA-DR, HLA-DO, HLA-DN, or HLA-DZ loci. Las técnicas, métodos y
 reactivos útiles para la selección, la clonación, la preparación y la expresión de las cadenas de CMH de clase II
 α cadenas, β cadenas, y $\alpha\beta$ heterodímeros, y las porciones extracelulares de los mismos, se ejemplifican en U.S.
 65 Patent Nos. 5,583,031, and 6,355,479.

5 [0045] La molécula auxiliar facilita la activación de células T naive, cuando se presentan tales células T naive con una molécula CMH de clase I o de clase II, en el que el péptido seleccionado está ligado a un antígeno o a un inmunogéno, o a ambos. La molécula auxiliar puede asistir a tales moléculas como: (i) moléculas co-estimuladoras, que son proteínas expresadas por las células presentadoras de antígeno tales como B7.1 (conocida previamente como B7 y también como CD80) y B7.2 (conocida como CD86), y CD70, la cual, entre otras cosas, se une a CD28 y/o a las moléculas en la superficie de las células T CTLA-4, teniendo efecto de este modo, por ejemplo, en la secreción de citoquinas, tales como interleucina (IL)-2, en la expansión de células T, en la diferenciación Th1, y en la supervivencia de células T a corto plazo (véase Kim et al., 2004, Nature, Vol. 22(4), pp.403-410); y (ii) en las moléculas de adhesión, por ejemplo, glicoproteínas de unión a carbohidratos, tales como selectinas, glicoproteínas de unión transmembranal, tales como las integrales, proteínas dependientes de calcio tales como cadherinas, y de proteínas de la superfamilia de inmunoglobulina transmembranal unipaso (Ig), como moléculas de adhesión intercelular (ICAM), que promueven, por ejemplo, célula a célula o por células de contacto a la matriz. Las moléculas de adhesión preferidas incluyen ICAMs, tales como ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 and LFA-3. Se pueden emplear cualquier número y combinación adecuado de moléculas auxiliares.

15 [0046] Las células huésped pueden ser modificadas para convertirse en líneas CPAA para uso en la activación de células T naive. Cualquier tipo de células capaces del crecimiento continuo en cultivo que pueden ser manipuladas para expresar las moléculas exógenas puede seleccionarse como una fuente de células huésped (véase p. ej. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1991), para resúmenes y procedimientos para el cultivo y el uso de una variedad de líneas celulares). Por consiguiente, las células huésped pueden proceder de cualquier variedad de especies, incluyendo especies de procariones, tales como especies de bacterias, o especies eucariotes, tales como, levaduras, insectos, plantas, micoplasmas, y mamíferos.

25 [0047] En realizaciones preferidas, las células huésped incluyen células primarias que se cosechadas y aisladas de un organismo, preferiblemente de un animal, o bien directamente son empleados en la preparación del sistema de presentación de antígenos o son utilizados después del cultivo de células primarias, o pasan, a través de un número limitado de generaciones, por ejemplo: de uno a cincuenta. Alternativamente, tales líneas celulares primarias pueden cultivarse bajo condiciones que permitan la generación de una línea celular inmortalizada que es descendiente de la línea celular primaria ancestral, que puede ser seleccionada de forma rutinaria. Tal inmortalización puede implicar el cultivo de células primarias a través de un número suficiente de generaciones de tal manera que se alcance un período de crisis, durante el cual la mayoría de las células primarias en el cultivo mueren mientras que un número relativamente pequeño de variantes que se dividen rápidamente continúa. Un cultivo que está basado por una variante tan persistente puede teóricamente pasar a través de cualquier número de generaciones, a condición de que las células se diluyan en el momento adecuado y por un factor de dilución apropiada, que los nutrientes y los medios adecuados se repongan, para permitir la propagación sostenida. Las líneas de células transformadas también pueden servir como una fuente de células huésped eucariotas que se pueden emplear en la preparación del sistema de presentación de antígenos. Tales líneas celulares transformadas pueden derivar de células tumorales tomadas de un animal que alberga tal tumor. Varios tipos de líneas celulares inmortalizadas o transformadas pueden ser adquiridas a partir de cualquier número de repositorios de línea celular, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), o pueden prepararse por el experto usando técnicas rutinarias ya conocidas o que estén disponibles en la técnica.

45 [0048] Los parámetros ejemplares pueden ser manipulados para obtener un conjunto deseado de célula huésped y el crecimiento y condiciones de cultivo de las CPAA incluyen temperatura, grado de aireación, porcentaje de saturación de oxígeno, porcentaje de saturación de dióxido de carbono, composición y concentración de nutrientes, y crecimiento estático versus agitado (es decir, agitación) crecimiento. Los procedimientos ilustrativos para la preparación, el crecimiento y cultivo de células huésped seleccionadas, tales como células de Schneider 2, se proporcionan en U.S. Patent Nos. 6,225,042, 6,355,479, and 6,362,001; Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989); Ausubel et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1992; y Frank, "Perspectives on Baculovirus Expression Systems", November 1998, OMRF Research Technology Forum.

55 [0049] Las células huésped seleccionadas para la modificación para convertirse en CPAA son preferentemente deficientes en el procesamiento de antígeno intracelular, tráfico intracelular de péptidos, y/o en la carga molecular de péptido intracelular de CMH de clase I o de clase II, o son poiquilotermos (es decir, menos sensibles a la exposición térmica que las líneas celulares de mamífero), o poseen ambas deficiencias y propiedad poiquiloterma (véase por ejemplo: DeSilva et al., 1999, J. Immunol., Vol. 163(8), pp. 4413-4420; Schumacher et al., 1990, Cell, Vol. 62(3), pp. 563-567; Ljunggren et al., 1990, Nature, Vol. 346(6283), pp. 476-480). Preferiblemente, las células huésped seleccionadas también carecen de la capacidad de expresar al menos una contraparte endógena (por ejemplo: una molécula endógena de MHC de clase I o una molécula endógena de clase II y/o moléculas endógenas auxiliares como se describió anteriormente) a la molécula exógena CMH de clase I o de clase II y a los componentes de la molécula auxiliar que se introducen en dichas células huésped. Además, las CPAA preferentemente retienen aquellas propiedades de deficiencia y poiquiloterma que fueron poseídas por las células huésped seleccionadas antes de su modificación para generar los aAPC. En realizaciones preferidas, las células huésped seleccionadas constituyen o son derivadas de un transportador asociado al procesamiento de antígenos

de línea celular (TAP) deficiente, como una línea celular de insecto.

5 **[0050]** Las células huésped seleccionadas preferidas son células de insectos poiquiloterms. Ejemplares de las líneas celulares de insectos aquellas seleccionadas de células huésped incluyen, por ejemplo, aquellos derivados de polilla (ATCC CCL 80), cogollero (ATCC CRL 1711), larva de mosquito (líneas ATCC CCL 125, CCL 126, CRL 1660, CRL 1591, CRL 6585, CRL 6586) y gusano de seda (ATCC CRL 8851). En especial, en realizaciones preferidas, la línea celular es una línea celular de *Drosophila*, tal como una línea celular de Schneider 2 (véase p. ej. Schneider, 1972, J. Embryol. Exp. Morph., Vol 27, pp. 353-365), una línea celular derivada de *Spodoptera*, tales como células SF-9 o células SF21, o una línea celular derivada de *Trichoplusia*, como las células Tn5, células H5 y células High-Five™ (Invitrogen).

15 **[0051]** Las células huésped seleccionadas se modifican con el fin de expresar moléculas exógenas de CMH de clase I o CMH de clase II, y preferentemente más de una de las moléculas exógenas auxiliares antes descritas, por métodos que comprenden la introducción de ácido nucleico xenogénico en las células huésped, generando de este modo los aAPC. Por lo tanto, una vez generadas las CPAA, mediante la modificación de las células huésped seleccionadas, pueden expresar cualquiera de las moléculas exógenas de CMH de clase I o moléculas exógenas CMH de clase II seleccionadas a partir de las moléculas de HLA descritos anteriormente, además a partir de uno a quince o más moléculas exógenas auxiliares seleccionadas de moléculas co-estimuladoras y moléculas de adhesión, adecuadas para la terapia de células deseada. En ciertas realizaciones preferidas, las células huésped se modifican para expresar moléculas exógenas HLA-A2, además de B7.1 exógeno (CD80), B7.2 (CD86), ICAM-1 (CD54), y LFA-3 (CD58). En otras realizaciones preferidas, las células huésped se modifican para expresar moléculas exógenas HLA-A2, además de B7.1 exógeno (CD80), ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58) y CD70. ELWTHSYKV (SEQ ID NO.35), KVAELVHFL (SEQ ID NO.36), YIFATCLGL (SEQ ID NO.37), HLYIFATCL (SEQ ID NO.38), MLMAQEALAF (SEQ ID NO.39), STLEKINKT (SEQ ID NO.40), KASEKIFYV (SEQ ID NO.41), SLLM-WITQCFL (SEQ ID NO.42), ELTLGEFLKL (SEQ ID NO.43), LTLGEFLKL (SEQ ID NO.44), SLLEKREKT (SEQ ID NO.45), TLGEDDPWL (SEQ ID NO.46), KLGLKPLEV (SEQ ID NO.47), YLWTSANT (SEQ ID NO.48), STAPPAHGV (SEQ ID NO.49), GMGSEELRL (SEQ ID NO.50), SLGSPVLGL (SEQ ID NO.51), YLFFYRKS (SEQ ID NO.52), CQQEETFL (SEQ ID NO.53), TLAKFSPYL (SEQ ID NO.54), NLTHVLYPV (SEQ ID NO.55), STFKNWPFL (SEQ ID NO.56), SLLQHLIGL (SEQ ID NO.57), FLDQRVFFV (SEQ ID NO.58), FLDQRVFFV (SEQ ID NO.59), FLDQVAFV (SEQ ID NO.60), GLDREQLYL (SEQ ID NO.61), VMQHLLSPL (SEQ ID NO.62), QQTHGITRL (SEQ ID NO.63), LQ-20 PLSGPG (SEQ ID NO.64), TLDRDSL (SEQ ID NO.65), QLYLELSQL (SEQ ID NO.66), KVLEYVIK (SEQ ID NO.67), KVADLVGFL (SEQ ID NO.68), KTWGQYWQV (SEQ ID NO.70) y VLDGLDVLL (SEQ ID NO.71).

35 **[0052]** Una mezcla de péptidos preferido para uso en los métodos de la presente invención incluyen al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en YMNGTMSQV (SEQ ID NO.5), ITDQVPFSV (SEQ ID NO.7), AAGIGILTV (SEQ ID NO.9), ELAGIGILTV (SEQ ID NO.10), SLLMWITQV (SEQ ID NO.27), FLWGPRLV (SEQ ID NO.30), TLAKFSPYL (PRAME; SEQ ID NO.54) y VLDGLDVLL (SEQ ID NO.71).

40 **[0053]** Además un método preferido adicional en esta realización, el método comprende aislar células T de una muestra de leucoféresis (también conocido como una muestra aféresis) obtenidas para su uso de un paciente en dicha etapa de contacto. Además, el método puede comprender también la re-estimulación de dichos linfocitos T activados antes de llevar a cabo la etapa de administración, comprendiendo dicho procedimiento de re-estimulación de esta manera: poniendo en contacto a los linfocitos T activados con al menos una citocina, promoviendo de este modo la proliferación de células T activadas; y la incubación de células T activadas con células autólogas irradiadas no-CD8+, células adherentes nonCD8+ 10 o células tratadas con psoraleno/UVA presentadoras de antígenos artificiales (aAPC), generando de este modo linfocitos T activados re-estimulados. Las citocinas preferidas incluyen aquellas seleccionadas del grupo que consisten en: IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21, IFN- γ , y TNF- α , y en el que dichos linfocitos T activados contienen linfocitos T citotóxicos activados. Además los linfocitos T activados, pueden ser sometidos a al menos una iteración del procedimiento de re-estimulación antes de realizar lo dicho y LFA-3. Cualquier combinación adecuada de moléculas co-estimuladoras y de adhesión se puede emplear en la generación de las CPAA.

55 **[0054]** Además, en ciertas realizaciones preferidas, las moléculas de microglobulina β 2 se obtienen de células huésped microglobulina β -2, que son distintas de las células huésped que se modifican para convertirse en las CPAAs. En tales formas de realización, un vector que codifica la molécula de microglobulina β -2 es introducida y expresada en las células huésped microglobulina β -2, y una muestra es recolectada de las moléculas de microglobulina β -2 expresadas. Alternativamente, una muestra de moléculas de microglobulina β -2 se puede derivar de un organismo que expresa un endógeno microglobulina β -2. Las CPAA que expresan moléculas exógenas CMH de clase I pueden ser entonces incubadas con la muestra de moléculas de microglobulina β -2.

65 **[0055]** Para obtener un nivel deseado de expresión de la secuencia de ácido nucleico, la secuencia de ácido nucleico se inserta en un vector que contiene un promotor para dirigir la transcripción, un terminador de transcripción/traducción, y, si es para una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión al ribosoma para iniciación traslacional. Ejemplares de promotores bacterianos se describen en Sambrook et al., *supra*; and Ausubel et al., *supra*. Ilustrativos de sistemas de expresión bacterianos para expresar proteínas

constituyentes incluyen *E. coli*, *Bacillus sp.*, and *Salmonella* (Palva et al., 1983, Gene 22:229-235; Mosbach et al., 1983, Nature 302:543-545). Los kits para tales sistemas de expresión están disponibles comercialmente. Sistemas de expresión adecuados de eucariotes adecuados para células de mamífero, levaduras, y células de insectos también ya conocidos o disponibles en la técnica.

[0056] Además de un promotor, cada vector contiene preferiblemente una unidad de transcripción o cassette de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión de ácido nucleico xenogénico en células huésped. Un ejemplo de vector contiene un promotor unido operativamente al ácido nucleico xenogénico, y señales requeridas para la poliadenilación eficiente de la transcripción, sitios de unión a ribosomas y terminación de la traducción. EL ácido nucleico xenogénico puede estar ligado a una secuencia de péptido señal escindible para promover la secreción de la proteína codificada por la célula transfectada. Ejemplares de tal señal incluyen a los péptidos señal de activador del plasminógeno tisular, insulina, y factor de crecimiento neuronal, y la esterasa de la hormona juvenil de *Heliothis virescens*. Elementos adicionales o alternativos, por ejemplo: elementos potenciadores, elementos endógenos promotores, intrones con o sin splice funcional en los sitios donador y aceptor, elementos de terminación de la traducción, o señales de poliadenilación, todos o algunos de los cuales pueden ser elementos endógenos de un ácido nucleico xenogénico seleccionado, pueden ser incluidos en el cassette o en el vector.

[0057] Ejemplares de vectores adecuados para la expresión de ácido nucleico xenogénico en células huésped bacterianas, de mamífero y/o de insectos incluyen: vectores pRmHa, incluyendo pRmHa-1, pRmHa - 2, y pRmHa - 3 (véase p. ej. International Publication No. WO 96/27392 y U.S. Patent Nos. 6,225,042 and 6,355,479); vectores pBR322-basados, pSKF, pET23D, pCDM8 (Seed, 1987, Nature, Vol. 329, pg. 840) y pMT2PC (Kaufinan et al., 1987, EMBO J, Vol. 6, pp. 187-195), pMAMneo (Clontech), pcDNA3 (Invitrogen), pMCIneo (Stratagene), pCMVSPORT, pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2-neo (ATCC 37593) pBPV-1(8-2) (ATCC 37110), pdBPV-MMTneo(342-12) (ATCC 37224), pRSVgpt (ATCC 37199), pRSV- neo (ATCC 37198), pSV2-dhfr (ATCC 37146), pUCTag (ATCC 37460), pMSCV, y IZD35 (ATCC 37565), pUC8, pUC9, pUC18, pBR322, y pBR329 (BioRad Laboratories), pPL y pKK223 (Pharmacia), y pBS (Stratagene) y M13mp19 (Stratagene). Los vectores preferidos para su uso en la preparación de las CPAA incluyen vectores que contienen elementos reguladores de virus en eucariotas, tales como vectores de SV40, vectores de virus papiloma, vectores de virus vaccinia, baculovirus, y vectores derivados de virus de Epstein-Barr. Tales vectores permiten la expresión del ácido nucleico xenogénico insertado bajo la dirección del promotor de CMV, promotor temprano de SV40, promotor tardío de SV40, promotor de metalotioneína, promotor del virus del tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otro promotor eficaz para la expresión en células eucariotas.

[0058] Han sido desarrollados una variedad de vectores de expresión de baculovirus recombinantes para la infección en células huésped derivadas de varias especies de insectos, tales como *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera fru-giperda*, and *Trichoplusia ni* (véase p. ej. International Publication No. WO 89/046699; Carbonell et al., 1985, J. Virol. Vol. 56, pg.153; Wright, 1986, Nature, Vol. 321, pg. 718; Smith et al., 1983, Mol. Cell. Biol., Vol. 3, pg. 2156; and Fraser, et al., 1989, Cell. Dev. Biol., Vol. 25, pg. 225). Vectores derivados de virus preferidos incluyen vectores basados en baculovirus, tales como: BaculoGold™ (BD Biosciences), BacPAK6 (BD Biosciences), ProEasy™ (BD Biosciences), y pDSVE.

[0059] Para emplear un vector que contiene ácido nucleico xenogénico que codifica las moléculas de CMH de clase I, moléculas CMH de clase II, moléculas coestimuladoras, o moléculas auxiliares, o una combinación de éstas, pueden ser utilizados una variedad de sistemas de vectores de expresión en huésped disponibles en la técnica. Tales sistemas de expresión en huésped representan vehículos por los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden expresar las moléculas cuando están transformadas o transfectadas con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas. Estos incluyen, por ejemplo, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo: *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias de codificación de CMH; levadura (por ejemplo: *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias de codificación de CMH; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión bacterianos recombinantes que contienen secuencias de codificación de CMH; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo: virus mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican al CMH; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo: células COS, CHO, BHK, HEK 293, 3T3) que albergan vectores de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo: promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo: el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5 K del virus vaccinia, el promotor del virus del bosque Semliki). Además, la secuencia de ácido nucleico que codifica las etiquetas del polipéptido también se pueden insertar en vectores seleccionados de tal manera que los polipéptidos exógenos expresados de la misma contienen la etiqueta polipéptido codificado, lo que permite métodos convenientes de aislamiento y/o detección. Ejemplares de etiquetas incluyen c-myc, hemaglutinina (HA)-tag, 6x-His-tag, etiqueta de la proteína de unión a maltosa, etiqueta VSV-G, etiqueta FLAG, y la etiqueta V5.

[0060] Los sistemas de expresión preferidos para la expresión de proteínas exógenas son sistemas de expresión que comprenden el uso de vectores de pRmHa, como pRmHa-1, pRmHa-2 y pRmHa-3 (Bunch et al., 1988, Nucl. Acids Res., Vol. 16, pp. 1043-1061), que son introducidas en células huésped, tales como células de insectos, preferiblemente células de *Drosophila*.

[0061] En formas de realización particularmente preferidas, los vectores de expresión son vectores inducibles. Los aAPC que contienen tales vectores de expresión inducibles primero pueden requerir de estimulación por un agente inductor, tal como CuSO₄, durante un período predeterminado de tiempo para efectuar la expresión de la proteína exógena apreciable. Preferiblemente, la expresión de molécula CMH es accionada por un vector de expresión inducible codificando tal molécula de CMH. Después de un periodo de inducción adecuado, por ejemplo, alrededor de 12 a 48 horas, el péptido seleccionado (que puede prepararse como se discute a continuación) pueden añadirse a una concentración predeterminada (por ejemplo, aproximadamente 100 mg/ml). Después de un período de incubación más extenso, por ejemplo, durante aproximadamente 12 horas a 27°C, el cultivo está listo para su uso en la activación de células CD8+. Aunque este periodo de incubación adicional puede acortarse o quizás omitirse, preferentemente el cultivo se deja incubar durante un tiempo previo a la adición de las células T naive para mejorar su resistencia frente al desafío de la temperatura. Por ejemplo, se ha añadido a los cultivos que seleccionan péptido capaces de expresar cantidades significativas de moléculas de CMH de clase I cargadas con péptido seleccionado incluso cuando se incuban durante períodos de tiempo prolongados a 37°C.

[0062] Ejemplares de procedimientos para introducir secuencias de nucleótidos extraños en las células huésped pueden ser utilizados para introducir el ácido nucleico xenogénico en células huésped seleccionadas incluye el uso de reactivos tales como Superfect (Qiagen), liposomas, transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, microinyección, vectores plasmídicos, vectores virales, aceleración de partículas biolístico (p. ej. la pistola de genes), o cualquier otro método apropiado para la introducción de ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético, ARN u otro material genético extraño en una célula huésped (véase por ejemplo: Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989)). Para la transfección estable de células huésped, será evidente que, dependiendo de la técnica de vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, para la resistencia a los antibióticos) se puede introducir en las células huésped junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como la geneticina (G418), puromicina, higromicina, y metotrexato. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden ser identificadas por la selección de fármacos (p. ej. células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

[0063] Al menos una porción de ácido nucleico xenogénico asociado con las CPAA, y en realizaciones preferidas, el ácido nucleico xenogénico y el ácido nucleico endógeno a las células huésped de las que se derivan las CPAA, se inactivan por reticulación posterior a, o concomitante con, la expresión de tales moléculas exógenas, de modo que esencialmente no hay crecimiento celular, la replicación o la expresión de ácido nucleico se produce después de la inactivación. Preferiblemente, la inactivación, mientras que la extracción de ácido nucleico incapaz de replicación adicional apreciable o expresión, no afecta considerablemente la actividad de la proteína exógena que se expresa en la superficie de las CPAA antes de la inactivación.

[0064] Las CPAA se inactivan con un agente a fin de efectuar el ácido nucleico (ADN o ARN) de reticulación. Ejemplares de agentes de reticulación se describen en U.S. Patent Application Publication No. US 2005/0054572; Biodrugs, Vol. 17(1), pp. 66-68 (2003) (amotosalen and light; INTERCEPT system); Schneider et al., Photochem. Photobiol., Vol. 67(3), pp. 350-357 (1998) (methylene blue and light); and U.S. Patent No. 7,067,251 (psoralen and UVA). Los agentes de reticulación que son o se hacen disponibles en la técnica puede ser seleccionado como se desee por el experto a través de la experimentación de rutina para inactivar el ácido nucleico asociado con las CPAA de acuerdo con la divulgación. Por ejemplo, para seleccionar un agente de reticulación adecuado el experto puede tener en cuenta ciertas propiedades asociadas con un agente de reticulación en particular, como la naturaleza de reticulaciones producidas por un agente de reticulación en particular, su relativa toxicidad, potencia, estabilidad, reactividad, y otras propiedades similares. Además, los agentes de reticulación plurales se pueden emplear para inactivar las CPAA. Adicionalmente, el tratamiento con el agente de reticulación puede ser concomitante con o después de la expresión de la molécula exógena y presentación en la superficie celular de la CPA. Los agentes reticulantes preferidos poseen una alta afinidad para el ácido nucleico (p. ej. ADN y ARN) o ambos ácidos nucleicos y el polipéptido interactúan con dichas moléculas de esta manera un aducto puede ser producido entre el agente seleccionado de reticulación y el ácido nucleico o el ácido nucleico y polipéptido. Tal agente de reticulación puede participar en cualquier formación de aductos intracatenarios o intercatenarios. En el caso de la formación de aductos intercatenarios, el componente de ácido nucleico del producto de adición contiene dos hebras de ADN, dos hebras de ARN, una hebra de ADN y una hebra de ARN, una hebra de ADN y un polipéptido, o un soporte de ARN y un polipéptido. En el caso de la formación de aductos intracatenarios, el componente de ácido nucleico del producto de adición comprende una hebra de ADN o una hebra de ARN. Preferiblemente, el componente de ácido nucleico del producto de adición comprende ADN.

[0065] La invención utiliza miembros de la familia de moléculas de psoraleno y derivados de los mismos (p. ej. Lin et al., *Trans- fusion*, Vol. 37(4), pp. 423-435 (1997)). Otros agentes de reticulación incluyen antraquinonas y derivados de antraquinona (p. ej. Kang et al., *Nucleic Acids Res.*, Vol., 24(20), pp. 3896-3902 (1996)); mitomicina, tales como mitomicina C y mitomicina D (ejemplo: Tomasz, "The mitomycins: natural cross-linkers of DNA." In *MOLECULAR ASPECTS OF ANTICANCER DRUG-DNA INTERACTIONS. VOLUME 2* (Neidle S and Waring M, eds.), pp. 313-349 (1994) and Warren et al., *Environ. Mol. Mutagen.*, Vol. 31(1), pp. 70-81 (1998)); mostazas nitrogenadas, tales como melfalán y clorambucilo (p. ej. Dronkert et al., *Mutat. Res.*, Vol. 486(4), pp. 217-247 (2001) and Sancar et al., *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 73, pp. 39-85 (2004)); antraciclinas, tales como adriamicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina y (p. ej. Cutts et al., *Mol. Cancer. Their.*, Vol. 2(7), pp. 661-670 (2003) and Sancar et al., *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 73, pp. 39-85 (2004)); compuestos de coordinación con platino, tales como cisplatino, carboplatino, nedaplatino, y oxaliplatino (p. ej. Reedijk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 100(7), pp. 3611-3616 (2003), Frankenberg-Schwager et al., *Toxicology*, Vol. 212, pp. 175-184 (2005), and Dronkert et al., *Mutat. Res.*, Vol. 486(4), pp. 217-247 (2001)) riboflavinas; otros compuestos o colorantes aromáticos, tales como tiazol tintes naranja, metilo colorantes verdes, bromuro de etidio, y dímero de etidio (véase p. ej. Tuite et al., *Eur. J. Clin. J. Biochem.*, Vol. 243(1-2), pp. 482-492 (1997), Faridi et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.*, Vol. 15(2), pp. 321-332 (1997), y Sancar et al., *Annu J. Clin. J. Biochem.*, Vol. 243(173), pp. 39-85 (2004), y similares.

[0066] Preferiblemente, el agente de reticulación es fotoactivable. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la divulgación la reticulación se lleva a cabo mediante la incubación de las CPAA con un agente reticulante fotoactivable y la exposición de las CPAA incubadas a una dosis de fotoactivación de una longitud de onda adecuada de radiación durante un tiempo suficiente para inactivar las CPAA, por ejemplo: haciendo que el agente de reticulación forme un aducto con un ácido nucleico asociado con las CPAA. En realizaciones preferidas, la reticulación logra la inactivación tanto del ácido nucleico xenogénico y del ácido nucleico endógeno asociado con las CPAA, esencialmente incapaces de replicación adicional o proliferación, de ese modo son eliminados o presentados. Preferiblemente, las cohechas de reticulación de las CPAA que son inactivadas y esencialmente libres de contaminación de microorganismos, como bacterias y virus, sin disminuir sustancialmente la función de la célula presentadora de antígeno de las CPAA. Una vez inactivadas las CPAA esencialmente son metabólicamente inactivas pero conservan la capacidad de presentar moléculas exógenas funcionales - las cuales fueron expresadas y presentadas antes de la inactivación - en su superficie, presentan el péptido seleccionado a las células T naive, y activan las células T naive a las que se han presentado los péptidos.

[0067] La inactivación y la esterilidad se pueden confirmar mediante, por ejemplo, ensayos de viabilidad de células infectadas; ensayos de infectividad viral; ensayos de actividad viral; ensayos de detección de proteínas virales endógenas; ensayos nucleicos virales endógenos de detección de ácidos; ensayos a base de PCR o ensayos a base de transcriptasa inversa (RT) PCR; ensayos de detección de ácidos nucleicos xenogénicos; citometría de flujo; y/o análisis FACS (véase, p. ej. Belanger et al., 2000, *Transfusion* 40:1503, 2000). Por ejemplo, células de insectos, que contengan ácido nucleico viral y otro ácido nucleico microbiano en medios de cultivo asociados, pueden ser transfectadas con moléculas exógenas codificadas de ácido nucleico xenogénico y después sometidas a reticulación. El sobrenadante obtenido a partir de las células sometidas puede entonces ser ensayada mediante métodos conocidos o disponibles en la técnica para determinar la cantidad de unidades formadoras de placas (UFP), que es una indicación directa de la actividad del ácido nucleico viral. Pueden emplearse métodos similares para determinar la actividad de otro ácido nucleico microbiano no-viral. Esencialmente, de preferencia las CPAA inactivadas de la invención no muestran ninguna UFP. Otros ensayos adecuados conocidos o disponibles en la técnica, tales como inmunoensayos para detectar la presencia de una cubierta de proteína viral, también se pueden utilizar para confirmar la ausencia de la replicación del virus y el trasplante de los productos de proteína viral.

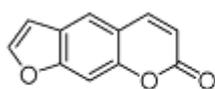
[0068] En realizaciones especialmente preferidas, el ácido nucleico xenogénico que está asociado con o deriva de otros componentes de las CPAA, tales como medios de cultivo, sangre o productos de sangre, y similares, se inactiva por exposición a un agente de reticulación fotoactivable. La fotorreacción es capaz de generar amplios márgenes de seguridad en la desinfección de productos microbianos en condiciones fisiológicas suaves.

[0069] Más preferiblemente, el agente reticulante fotoactivable es un miembro de la familia de moléculas de psoraleno, tales como aquellos ilustrados en International Publication números: WO 91/06665 y WO 96/39820, Lin et al., 1997, *Transfusion*, Vol. 37(4), pp. 423-435, and Belanger et al., *Transfusion* 40:1503, 2000. Tales agentes de reticulación pueden ser fotoactivados exponiéndolos a una dosis de fotoactivación de radiación. Métodos de prueba, manipulación y optimización, parámetros como la cantidad de agente de reticulación y la concentración, intensidad de la radiación y duración de tiempo, se pueden seleccionar de forma rutinaria en la orientación de la técnica (véase p. ej. International Publication Números: WO 96/39820 y WO 91/06665). La fotorreacción de psoraleno es ventajosa para la inactivación de virus conocidos y desconocidos en los productos activos. La inactivación de virus con psoraleno ya ha demostrado su utilidad como antígenos no infecciosos para su uso en inmunoensayos y vacunas experimentales (Hanson, *Blood Cells* 18:7, 1992).

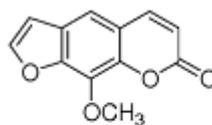
[0070] Los dispositivos adecuados que se pueden emplear para administrar una dosis de fotoactivación de radiación, y de este modo conseguir la reticulación, pueden ser seleccionados o diseñados en base a las enseñanzas en la técnica, p. ej. como se ejemplifica en International Publication Números: WO 96/39820 y WO 91/06665. Tales dispositivos ilustrados pueden ser modificados adecuadamente de modo que se adapten a las

necesidades de una forma de realización particular de la invención. Por ejemplo, los dispositivos que tienen una fuente de radiación electromagnética que está integrado en una unidad de fotoactivación puede comprender: medios para proporcionar longitudes de onda apropiadas de radiación electromagnética para causar la fotoactivación de al menos un agente de reticulación; medios para soporte de al menos una muestra que contenga las CPAA, preferiblemente una pluralidad de tales muestras, en una relación fija con los medios de radiación proporcionados durante la fotoactivación; y medios para mantener la temperatura de las muestras dentro de un intervalo de temperaturas deseado durante la fotoactivación. De este modo, un ejemplo de realización de reticulación se puede realizar por etapas que comprenden: soporte de una pluralidad de recipientes de muestra, conteniendo cada uno una composición de CPAA y un agente reticulante fotoactivable, en una relación fija con una fuente fluorescente de radiación electromagnética; irradiación de la pluralidad de contenedores de muestras de forma simultánea con la radiación electromagnética para causar la fotoactivación del agente de reticulación; y manteniendo la temperatura de la composición en cada recipiente dentro de un intervalo de temperaturas deseado durante la fotoactivación.

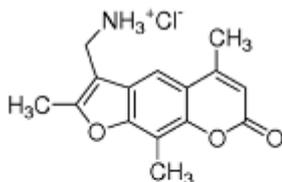
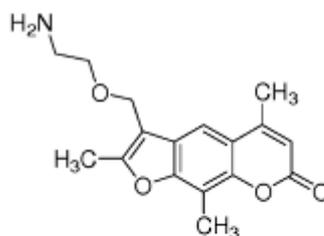
[0071] En la invención, el agente de reticulación es un derivado de psoraleno. Un derivado de psoraleno fotoactivado por irradiación UV de onda larga se ha utilizado en diversas aplicaciones para inactivar el ácido desoxirribonucleico y los virus de ácido ribonucleico (véase p. ej. Brockstedt et al., Nat. Med., Vol. 11(8), pp. 853-860 (2005); Lubaki et al., AIDS Res. Hum. Retrovirus, Vol. 10(11), pp. 1427-1431 (1994)) y los psoralenos se han descrito como la formación de monoadductos covalentes y enlaces cruzados con bases de pirimidina de ADN y ARN en iluminación con luz UVA (Redfield et al., Infect. Immun., Vol. 32(3), pp. 1216-1226). Además, Therakos ha probado clínicamente un tratamiento con psoraleno/UV para pacientes con linfoma. Derivados de psoraleno a modo de ejemplo, los cuales son compuestos que tienen una estructura química que comprende el núcleo del psoraleno o motif, se muestran a continuación:



psoraleno



8-metoxipsoraleno (8-MOPs)

4'-(aminometil)-4,5',8-
psoraleno

amotosaleno (S-59)

[0072] Preferiblemente, se emplea un grado de alta pureza clínica o similar de un derivado de psoraleno para la reticulación de ácido nucleico asociadas con las CPAA. El derivado de psoraleno se pone en contacto con las CPAA a una concentración adecuada, p. ej. de aproximadamente 0,1mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, de preferencia de 1 mg/ml a 55 mg/ml, como 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 55 mg/ml. La composición de las CPAA con psoraleno-tratado se expone posteriormente a UVA (irradiado con), que es de onda larga (de aproximadamente 320 nm a aproximadamente 400 nm) radiación ultravioleta, durante un tiempo suficiente para lograr el grado deseado de inactivación. Por ejemplo, una exposición UVA de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos, como 1, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 minutos, puede ser seleccionado. La intensidad UVA durante esta exposición se selecciona en vista del período de tiempo de exposición elegido para alcanzar el grado deseado de inactivación, por ejemplo, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 Julios/cm² (J/cm²) y preferiblemente, como 1, 5, 10, 15, o 20, 40, 50 o 100 J/cm². Aunque el tratamiento de reticulación con 8-MOPs más 1 Julio/cm² durante 2 minutos es suficiente para inactivar las células de *Drosophila*, preferiblemente también se realiza la reticulación con el fin de inactivar cualquier contaminante viral y mantener o mejorar la función del CPA (en comparación con las CPAA no tratadas). En una realización a modo de ejemplo, la dosis de un derivado de psoraleno (5 mcg/ml; 8-MOPs) y la exposición UVA (irradiación a 320-380 nm durante 5 minutos) es similar a la utilizada para inactivar las células infectadas por VIH-1 (véase Watson et al., AIDS Res Hum Retroviruses 6:503, 1990). Esta fotorreacción es suficiente para inactivar Baculovirus aislado de las células Sf9 infectadas tratadas con psoraleno/UV después de la infección. La suministro viral obtenido en el sobrenadante no contiene virus infeccioso, donde el control viral de células Sf9 infectadas contienen cantidades significativas de UFP después de un solo ciclo

de infección (8×10^8 PFU/ml). La fotorreacción evita la replicación del virus en el indicador de la línea celular y la producción de partículas infecciosas que contienen el ácido nucleico. En otro ejemplo de realización, 2 mcg/ml UVADEX[®] (8-MOPs) de grado clínico e irradiación UVA a 5 Julios/cm² durante 10 minutos se utilizan para inactivar virus de insecto 10^8 pfu.

[0073] Un inmunoensayo para detectar la presencia de una cubierta de proteína viral de preferencia se realiza para confirmar la ausencia de replicación del virus y la traducción de los productos de proteína viral. Las pruebas se pueden realizar para confirmar que el tratamiento con psoraleno/UV de células de *Drosophila* cultivadas a 27° C no se replican, y que los recuentos de células son insignificantes después de 14 días de cultivo. El tratamiento impide la replicación posterior de las células de *Drosophila* las cuales permanecen inactivas hasta que se lisan por la falta de crecimiento.

[0074] Varios dispositivos de UVA que emiten radiación ultravioleta en el intervalo de 320-400 nm están disponibles o se pueden construir fácilmente usando una fuente de emisores-UVA adecuado o una fuente más amplia de radiación ultravioleta-gama con filtro u otros medios para restringir la longitud de onda de la radiación dentro de la gama UVA. Se dice que tales dispositivos tienen gama baja y gama alta de longitud de onda "puntos de corte", que no permiten longitudes de onda por debajo o por encima de estos puntos de corte para irradiar a las CPAA tratadas con psoraleno. Tales dispositivos son también preferiblemente capaces de proporcionar longitudes de onda sustancialmente precisas de radiación, las cuales tienen un medio de ancho de banda de aproximadamente 10 nm de distancia, preferiblemente de aproximadamente 8 nm, preferiblemente de aproximadamente 6 nm, preferiblemente no mayor que 5 nm. Una longitud de onda preferida de radiación utilizada para fotoactivar un agente de reticulación es de aproximadamente 365 nm con 5 nm medio de ancho de banda. Un ejemplo de dispositivo comprende una fuente de emisión que contiene una lámpara UV de longitud de onda larga de alta intensidad equipada con una bombilla de inundación de mercurio. Mientras que la posición o la orientación de la fuente de emisión de radiación de un dispositivo de este tipo se pueden seleccionar adecuadamente, preferiblemente la fuente de UVA se coloca encima de la muestra a irradiar. Otro ejemplo de dispositivos UVA incluyen sistemas de irradiación modificados como el modelo 4R4440 de Baxter Biotech (véase también, Lin et al., 1997, Transfusion, Vol. 37(4), pp. 423-435) y aquellos descritos en International Publication No. WO 96/39820.

[0075] Puede ser conveniente mezclar las CPAA y el agente de reticulación antes o durante el proceso de fotoactivación, el cual puede realizarse con, por ejemplo, un agitador que se coloca de modo que la composición de CPAA y el agente de reticulación se puedan mezclar a fondo. Además, puede ser conveniente llevar a cabo la fotoactivación en condiciones esencialmente anaerobias. Los métodos ejemplares que pueden emplearse para efectuar la fotoactivación esencialmente anaeróbica se ejemplifican por Lin et al., 1989, Blood, Vol. 74, pp. 517-525, and Lin et al. 1997, Transfusion, Vol. 37, pp. 423-435.

[0076] En una realización preferida, un ciclo de congelación-descongelación se lleva a cabo antes, durante, o después de la reticulación. En un ejemplar de ciclo de congelación-descongelación, las CPAA pueden congelarse por contacto de un recipiente adecuado que contenga las CPAA con una cantidad apropiada de nitrógeno líquido, dióxido de carbono sólido (es decir, el hielo seco), o un material de baja temperatura similar, de manera que se produzca la congelación rápidamente. Las CPAA congeladas a continuación se descongelan, ya sea por eliminación de las CPAA a partir del material de baja temperatura y la exposición a condiciones de temperatura ambiente, o por un proceso de descongelación facilitado en el que se emplea un baño de agua tibia o la mano tibia para facilitar un tiempo de descongelación más corto. Además, las CPAA pueden ser congeladas y almacenadas durante un período de tiempo prolongado antes de la descongelación. Las CPAA congeladas también puede ser descongeladas y luego liofilizadas antes de seguir usándolos. Preferiblemente, los conservantes los cuales pueden afectar negativamente los procedimientos de congelación-descongelación, tales como dimetil sulfóxido (DMSO), polietilenglicoles (PEG), y otros conservantes, están ausentes de los medios que contienen las CPAA que experimentan el ciclo de congelación-descongelación, o esencialmente se eliminan, mediante la transferencia de las CPAA a medios de comunicación que esencialmente están carentes de tales conservantes.

[0077] Varias ventajas se pueden conseguir a través de la práctica de la invención. Por ejemplo, la capacidad de las células tratadas con UV/psoraleno, y esas células tratadas con UV/psoraleno, congeladas y descongeladas por 2 ciclos, son mejores que las CPAA viables, las células de *Drosophila* no-tratadas viven. La capacidad de mantener o incluso mejorar la función CPA de la línea celular de *Drosophila* 668 con el protocolo psoraleno/UV y psoraleno/UV/congelación/descongelación ayuda a asegurar que las células de *Drosophila* se inactiven y se lisen antes de la exposición a las células CD8 humanas. Esto añade una característica de seguridad importante, sin disminuir la capacidad de estimulación única de las CPAA. Las células CD8 que son estimuladas específicamente por el psoraleno/UV y las células estimuladas por psoraleno/UV/congeladas/descongeladas crecen tan eficientemente como las estimuladas con viable, las células de *Drosophila* viven. Además, la naturaleza específica de antígeno de los CTL CD8 generados al final del ciclo de cultivo *ex vivo* es mayor que la detectada con las células CPA no tratadas. El método de la invención para la inactivación viral y el ácido nucleico de la célula huésped impide el crecimiento celular y la replicación viral en las células tratadas. La capacidad para mantener la función importante de la CPA de las células de *Drosophila* al tiempo que garantiza la seguridad del producto de terapia celular es un resultado muy conveniente y debería ayudar a aliviar las preocupaciones, aumentando la calidad de su seguridad,

de manera que la terapia de células ahora se puede considerar una célula no-humana "muerta" en lugar de un producto xenotrasplantes.

5 **[0078]** En realizaciones preferidas, las moléculas de CMH codificadas por el ácido nucleico xenogénico se expresan mediante las CPAA como moléculas vacías. Tales moléculas vacías son esencialmente desprovistas de cualquier péptido antigénico unido o péptido inmunogénico o fragmentos de tales péptidos. Como tal, las CPAA se pueden cargar con una o más especies de péptidos seleccionados para la carga, con "péptido seleccionado" se entiende una o más especies de péptidos antigénicos, especies de péptidos inmunogénicos, o fragmentos de tales especies de péptidos. En algunas formas de realización, las moléculas vacías de CMH expresadas en la superficie
10 de los CPAA se cargan con una sola especie de péptidos. En otras realizaciones preferidas, el péptido seleccionado comprende una pluralidad de especies, tales como de dos a seis o más especies, se utilizan para cargar moléculas vacías de CMH. La carga de la molécula CMH con el péptido seleccionado puede ser realizada en un momento adecuado después que se ha producido la expresión de la proteína exógena en la superficie de las CPAA. La carga de la molécula CMH con péptido seleccionado también se puede realizar antes de, concomitante
15 con, o después de la inactivación de ácido nucleico xenogénico como se describe anteriormente.

[0079] Como se mencionó anteriormente, las CPAA se cargan con el péptido seleccionado. La exposición de las CPAA al péptido seleccionado puede realizarse concomitante con, o después de, la expresión de las moléculas exógenas descritos anteriormente en la superficie de las células modificadas. Como resultado de esta exposición,
20 las CPAA se cargan con el péptido seleccionado, preferiblemente de modo que el péptido seleccionado ocupe los sitios de unión de antígeno o inmunógeno en las moléculas CMH expresadas en la superficie de las CPAA, donde los sitios de unión estaban desprovistos de péptido unido antes de la exposición al péptido seleccionado. Una vez cargado, el péptido seleccionado es capaz de ser presentado a las células T naive de una manera que provoca la activación de las células T naive.

[0080] El péptido seleccionado empleado para cargar las moléculas CMH exógenas vacías se selecciona de acuerdo con la clase particular de tal molécula(s) CMH para ser expresado por las CPAA. Por lo tanto, en realizaciones en las que se desee que las CPAA expresen moléculas de CMH de clase I vacías, el péptido
30 seleccionado que se une a dichas moléculas vacías CMH de clase I se pone en contacto con tales CPAA de manera que las moléculas de clase I se carguen con dicho péptido seleccionado. En realizaciones en las que se desee que las CPAA expresen moléculas vacías CMH de clase II, el péptido seleccionado que se une a dichas moléculas CMH de clase II vacías se pone en contacto con tales CPAA de manera que las moléculas de clase II se carguen con dicho péptido seleccionado. En realizaciones en las que tanto las moléculas CMH de clase I como las moléculas CMH de clase II deben ser expresadas por las CPAA, tanto a la unión en la clase I al péptido
35 seleccionado como a la unión en la clase II al péptido seleccionado puede ser utilizados para contactar a las CPAA de manera que tanto las moléculas de clase I y clase II estén cargadas de péptido seleccionado. En realizaciones en las que se selecciona una especie de péptidos, la selección de especie de péptidos comprende una pluralidad de moléculas de péptidos, de los cuales cada uno es idéntico al otro en la composición de aminoácidos y en la secuencia. En realizaciones en las que se seleccionan dos o más especies de péptidos, cada uno de los dos o más especies de péptidos seleccionados comprende independientemente una pluralidad de moléculas de péptidos, de los cuales cada uno es idéntico al otro en la composición de aminoácidos y la secuencia. De estas dos o más especies, cada una se utiliza para contactar a las CPAA, ya sea simultáneamente o en distintos casos. En cada una de estas realizaciones, en las CPAA se producen complejos multi-antigénicos o péptido-CMH multi-
40 inmunogénico. La carga de péptido seleccionado en moléculas del CMH vacías se produce preferiblemente bajo condiciones de unión biológica aproximada, las cuales puede ser aproximadas *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*.

[0081] Especies de péptidos a modo de ejemplo que se pueden seleccionar incluyen los siguientes, en donde la proteína de la que deriva cada péptido y el identificador de secuencia asignado a cada péptido se indican entre paréntesis: SILSLKEAST (C- Lectin; SEQ ID NO.1), KMASRSMRL (C-Lectin; SEQ ID NO.2), ALALAALLVV (Pec
50 60; SEQ ID NO. 3), ALLVVDREV (Pec60; SEQ ID NO. 4), YMNGTMSQV (Tyrosinase; SEQ ID NO.5), YMDGTMSQV (Tyrosinase; SEQ ID NO.6), IT- DQVPFSV (gp100; SEQ ID NO.7), YLEPGPVTA (gp100; SEQ ID NO.8), AAGIGILTV (MART-1; SEQ ID NO.9), ELA- GIGILTV (MART-1; SEQ ID NO.10), CLTSTVQLV (Her-2/neu; SEQ ID NO.11), HLYQGCQVV (Her-2/neu; SEQ NO.12), KIFGSLAFL (Her-2/neu; SEQ ID NO.13), IISAVVGIL (Her-2/neu; SEQ ID NO.14), PLTSIISAV (Her-2/neu; SEQ ID NO.15), VMAGVGSPLYV (Her-2/neu; SEQ ID NO.16), VLVKSPNHV (Her-2/neu; SEQ ID NO.17), ELVSEFSRM (Her- 2/neu; SEQ ID NO.18), YLSGANLNL (CEA; SEQ ID NO.19), GPLTLPV (AES; SEQ ID NO.20), SLLMWITQC (NY- ESO-1; SEQ ID NO.21), KALFAGPPV (CA-125; SEQ ID NO.22), YLETFREQV (CA-125; SEQ ID NO.23), GLQSPKSPL (CA-125; SEQ ID NO.24), VLLKLRRPV (CA-125; SEQ ID NO.25), ELYIPSVDL (CA-125; SEQ ID NO.26), SLLMWITQV (NY-ESO-1; SEQ ID NO.27), ILAKFLHWL (Telomerase; SEQ ID NO.28), STAPPVHNV (MUC-1; SEQ ID NO.29), FLWG- PRALV (MAGE-3; SEQ ID NO.30), FMWGNLTLA (CA-125; SEQ ID NO.31), RLVDDFLV (Telomerase; SEQ ID NO.32), HLSTAFARV (G250; SEQ ID NO.33), QLSLLMWIT (NY-ESO-1; SEQ ID NO.34), ELWTHSYKV (FBP; SEQ ID NO.35), KVAELVHFL (MAGE-3; SEQ ID NO.36), YIFATCLGL (MAGE-3; SEQ ID NO.37), HLYIFATCL (MAGE-3; SEQ ID NO.38), MLMAQEALAF (CAMEL; SEQ ID NO.39), STLEKINKT (SSX-4; SEQ ID NO.40), KASEKIFYV (SSX-2; SEQ ID NO.41), SLLMWITQCFL (NY-ESO-1; SEQ ID NO.42), ELTLGEFLKL (Survivin; SEQ ID NO.43), LTLGEFLKL (Survivin; SEQ ID NO.44), SLLEKREKT (SP17; SEQ ID NO.45), TLGEDDPWL (SART-1; SEQ ID NO.46),
65

KLGLKPLEV (SART-1; SEQ ID NO.47), YLWTSKNT (SCP-1; SEQ ID NO.48), STAPPAHGV (MUC-1; SEQ ID NO.49), GMGSEELRL (LIVIN; SEQ ID NO.50), SLGSPVLGL (LIVIN; SEQ ID NO.51), YLFFYRKSV (hTRT; SEQ ID NO.52), CQQEETFLL (CA-125; SEQ ID NO.53), TLAKFSPYL (CEBADOR; SEQ ID NO.54), NLTHVLYPV (CEBADOR; SEQ ID NO.55), STFKNWPFL (Survivin; SEQ ID NO.56), SLLQHLIGL (CEBADOR; SEQ ID NO.57), FLDQRVFFV (gp100; SEQ ID NO.58), FLDQRVFFV (gp100; SEQ ID NO.59), FLDQVAFVV (gp100; SEQ ID NO.60), GLDREQLYL (MUC-16; SEQ ID NO.61), VMQHLLSPL (MUC-16; SEQ ID NO.62), QQTHGITRL (MUC-16; SEQ ID NO.63), LQPLSGPGL (MUC-16; SEQ ID NO.64), TLDKDSLYV (MUC-16; SEQ ID NO.65), QLYLELSQL (MUC-16; SEQ ID NO.66), KVLEYVIKV (MAGE-1; SEQ ID NO.67), KVADLVG-FL (MAGE-1; SEQ ID NO.68), KTWGQYWQV (SEQ ID NO.70) y VLDGLDVLL (SEQ ID NO.71). Los péptidos preferidos incluyen la topoisomerasa II, la integrina $\beta 8$ precursor de la subunidad, MUC-1, MAGE-B2, STAT 1, γ -Catenina, y H-RYK (RTK 6). Otros péptidos adecuados se pueden seleccionar de forma rutinaria. Véase p. ej. U.S. Patent Application Publication No. 2003/0022820 para algunas especies de péptidos ilustrativos.

[0082] Las especies de péptidos seleccionados pueden ser presentados a las células y cargados en las CPAAs a través de una variedad de medios y técnicas conocidas o que se vuelvan disponibles en la técnica. Los péptidos pueden presentarse de una manera que les permita entrar en una piscina intracelular de péptidos. Por ejemplo, los péptidos pueden presentarse mediante carga osmótica. Preferiblemente, los péptidos se añaden al medio de cultivo del sistema de las CPAA. Los péptidos pueden añadirse al medio de cultivo en forma de un polipéptido o proteína intacto que se degrade subsiguientemente mediante procesos celulares, tales como la degradación enzimática. Alternativamente, el polipéptido o proteína intacto puede degradarse a través de algunos otros medios, tales como la digestión química (p. ej. bromuro de cianógeno) o proteasas (p. ej. tripsina y quimotripsina) antes de la adición al medio de cultivo del sistema de las CPAA. Alternativamente, toda una secuencia de la proteína o polipéptido se puede clonar en un vector apropiado e insertarse en una célula procariótica, de tal manera que la célula genere cantidades significativas del polipéptido antigénico que luego se coseche, se purifique y se digiera en péptidos que luego se añaden al medio de cultivo del sistema de las CPAA. La purificación de las proteínas o péptidos se puede lograr a través de diversas técnicas adecuadas que son conocidas o se vuelven disponibles en la técnica, tales como cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de afinidad, precipitación de proteínas, intercambios de tampón, intercambio iónico, cromatografía, cromatografía de interacción hidrofóbica o cromatografía de exclusión por tamaño.

[0083] En realizaciones preferidas, las CPAA están inactivadas en un punto posterior a la expresión de CMH exógena y de moléculas auxiliares, tales moléculas se presentan en la superficie de las CPAA, y en la carga de moléculas CMH presentadas con el péptido seleccionado. En consecuencia, tales CPAA inactivadas y cargadas con péptidos seleccionados, se vuelven esencialmente incapaces de proliferar o replicar, retienen la función de presentación de péptidos seleccionados, y preferiblemente también conservan la función de activación de las células T naive. Además, los fragmentos de fragmentos de las CPAA, como las membranas celulares intactas y fragmentos de las membranas celulares, que contienen CMH cargado con péptido seleccionado y moléculas auxiliares, se pueden emplear opcionalmente para activar las células T naive. Cualquier método adecuado conocido o disponible en la técnica se puede emplear para preparar, aislar y manipular tales fragmentos de CPAA.

[0084] Como se describe anteriormente las CPAA preparadas e inactivadas presentan moléculas vacías de CMH exógenas, de manera que se consigue una cantidad suficiente de péptido seleccionado, ventajosamente puede añadirse en la superficie de las CPAA una alta densidad de complejos CMH de péptido seleccionados, esta alta densidad es sustancialmente mayor que la densidad observada en CPA de mamíferos de tipo salvaje. Una célula T naive/cultivo inactivado de CPAA puede ser mantenido durante todo el tiempo que sea adecuado para activar y enriquecer una población terapéuticamente efectiva de los CTL. Por ejemplo, la duración del tiempo de cultivo de células T naive /CPAA inactivada es de aproximadamente un día a aproximadamente diez días, tal como de dos a nueve días, de tres a ocho días, o de cuatro a seis días.

[0085] En una realización preferida, las CPAA o fragmentos de CPAA preparadas e inactivadas como se describe anteriormente poseen una mayor función de CPA con respecto a la función de CPA poseída por las CPAA que no han sido tan inactivadas. La función de la CPA puede ser reflejada en mayor medida por la actividad del CTL en los CTL que están activados por contacto con las CPAA inactivadas con respecto a la medida de la actividad del CTL en los CTL que se activan por contacto con las CPAA que no están inactivadas. La actividad del CTL puede ser medido por uno o más parámetros de la activación de CTL, tales como un grado de expresión de la proteína de la superficie celular por una o más proteínas indicativas de la activación de células del CTL (tal como la expresión de la superficie celular CD69), un grado de diferenciación, un grado de la capacidad específica de eliminación citotóxica, un grado de lisis celular específica, o un grado de la producción de citosinas asociadas al CTL. Además, las células T activadas pueden ser detectadas o aisladas por tinción de tetramero péptido- CMH (pMHC), en el que las células T activadas detectadas son específicas para el péptido seleccionado presentado por las CPAA. En una realización preferida, la inactivación se logra mediante la formación de compuestos de las CPAA con un derivado de psoraleno y exponiendo el complejo a UVA a fin de lograr la expresión mejorada de CD69.

[0086] Las células T activadas pueden ser separados de las CPAA utilizando una técnica adecuada conocida o disponible. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales específicos para las CPAA, para los péptidos cargados en las CPAA, o para las células T activadas (o una porción de las mismas) pueden emplearse para unirse a un ligando complementario apropiado. Los anticuerpos para el etiquetado de células pueden entonces ser extraídos

con una técnica adecuada de la mezcla de células T y CPAA/activadas, tal como un método de inmunoprecipitación o inmunoensayo. Alternativamente, una etapa de separación puede ser omitida por completo y los CPAA inactivadas pueden dejarse en cultivo con las células T activadas.

5 **[0087]** En una realización preferida, las células T CD8+ naive se seleccionan para la activación, y las cantidades
deseadas de los CTL resultante son empleadas para preparar producto de terapia celular para administración
terapéutica. Preferiblemente, antes de la administración de una o más pruebas de control de calidad, se realizan
10 pruebas en los linfocitos T activados o en la terapia celular. En realizaciones preferidas, las pruebas de control de
calidad comprenden la realización de una o más pruebas para confirmar: compatibilidad de HLA entre el paciente
y los linfocitos T; análisis de citometría de flujo (CD8+, TCR+); esterilidad (sin crecimiento bacteriano o fúngico);
gramstain negativo para bacterias; micoplasma negativo para PCR / ELISA; no ADN de *Drosophila* residual;
ausencia de cDNA de virus de insectos; viabilidad (> 72% viable); y la actividad citolítica mediante el ensayo de
CTL.

15 **[0088]** Para tratar a un sujeto, según la invención es administrada una cantidad eficaz de un producto de terapia
celular a un sujeto que padece o es diagnosticado de una enfermedad, trastorno o condición. Una "cantidad eficaz"
es una cantidad o dosis suficiente para producir generalmente un beneficio terapéutico o profiláctico deseado en
pacientes en necesidad de tal tratamiento. Las cantidades o dosis eficaces de los productos de terapia celular de la
20 presente invención pueden determinarse mediante métodos rutinarios tales como modelado, estudios de escalado
de dosis o pruebas clínicas, y tomando en cuenta los factores de rutina, p. ej., el modo o vía de administración, la
entrega del producto, la farmacocinética del producto de terapia celular, la gravedad y curso de la enfermedad,
trastorno, o afección, la terapia previa o en curso del sujeto, el estado de salud del sujeto y la respuesta a los
fármacos, y el juicio del médico tratante. A modo de ejemplo de cantidades de dosificación, las poblaciones de
células pueden contener de 1×10^6 a 1×10^{12} células T activadas, tales como 1×10^8 a 1×10^{11} o 1×10^9 a $1 \times$
25 10^{10} células T activadas para un humano adulto aproximadamente.

[0089] El producto de terapia celular se prepara como una composición terapéutica que comprende células T
activadas y un vehículo adecuado para el mantenimiento de las mismas hasta que se infunden en el sujeto, tal
como un diluyente farmacéuticamente aceptable o un disolvente. En una realización preferida, el producto de
30 terapia celular contiene de 1×10^9 a aproximadamente 10×10^9 CTLs en una solución de inyección de lactato de
Ringer, USP (76% (v/v), 5% de solución salina normal, dextrosa USP (76% (v/v)), y albúmina de suero humano al
25% (HSA; 20% (v/v)).

[0090] Puede emplearse cualquier técnica adecuada para la administración de composiciones que contienen
35 componentes celulares en un sujeto. Por ejemplo, puede emplearse la administración de células de los CTL
activados mediante infusión intravenosa. Múltiples infusiones pueden ser necesarias o indicadas, y estas infusiones
pueden ocurrir durante un período de varias semanas o más. Técnicas ejemplares se describen, por ejemplo en
U.S. Patent Números 4,844,893 y 4,690,915.

40 **[0091]** Opcionalmente, los productos o preparaciones de terapia celular pueden complementarse para incluir otro
inmunomodulador, preferiblemente inmunoestimulante, componentes en adición con las CPAA cargadas con
péptido seleccionado. Tales componentes adicionales se pueden añadir antes de, concomitante con, o después de
poner en contacto a las células T naive con las CPAA cargadas con péptido. La selección de los puntos de tiempo
deseados, las concentraciones de dosis y frecuencias en los que tales componentes inmunomoduladores
45 suplementarios, preferentemente inmunoestimulante, son añadidos pueden seleccionarse de acuerdo con las
consideraciones pertinentes, tales como la velocidad deseada de proliferación, la tasa de expansión, el número de
células, la longevidad, o inmunogenicidad. Los componentes suplementarios o inmunomoduladores pueden ser, por
ejemplo, uno o más leucocitos distintos de células T no tratadas previamente, citocinas, linfoquinas, quimiocinas y
anticuerpos. Ejemplares de leucocitos que pueden seleccionarse incluyen células adherentes, tales como: células
50 no-adherentes CD8, CD14+, monocitos, macrófagos, células T auxiliares, células T de memoria, y otros leucocitos
que pueden impartir un inmunomodulador, preferiblemente inmunoestimulante, efecto o estímulo. Tales leucocitos
pueden ser de origen autólogo o heterólogo. En una realización preferida, los leucocitos seleccionados son de
origen autólogo. Ejemplares de citocinas incluyen las interleucinas, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7,
IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21, interferones, tales como γ -interferón, y factores de necrosis tumoral
55 (TNFs), tales como TNF- α (véase, p. ej. Tizard I., IMMUNOLOGY: AN INTRODUCTION, 3rd Edition, pp. 129-143,
(1992) o CD70 (véase, p. ej. Gen Bank accession number L08096 and NCBI accession number NM_001252), LT,
4-1 BBL y OX40L; U.S. Patent Application Publication No. 2002/0119121; and International Publication No. WO
2002/022648). Las citocinas pueden ser de origen recombinante o natural. En una realización preferida, las
citocinas seleccionados son de origen recombinante. Ejemplares de anticuerpos incluyen anticuerpos
60 monoclonales anti-CD3, como el marcado como ORTHOCLONE OKT@3 (muromonab-CD3).

[0092] En una realización especialmente preferida, células autólogas no-CD8, células adherentes CD14+, IL-2, IL-
7, y la preparación de anticuerpos anti-CD3 monoclonal (OKT@3) se emplean como componentes
inmunoestimuladores adicionales en los métodos de preparación de terapia celular. En tales realizaciones, las
65 células T naive que han sido sometidas a la estimulación primaria con las CPAA cargadas con péptido seleccionado

5 son sometidas a reestimulación poniéndolas en contacto con cantidades eficaces de IL-2 recombinante e IL-7 recombinante (p. ej. aproximadamente 1-100 Units/ml IL-2 y preferentemente 1, 10, 15, 20, 50 or 100 Units/ml IL-2 y alrededor de 1-100 Units/ml IL-7, y preferiblemente 1, 10, 15, 20, or 50 Units/ml IL-7) y después poniéndolas en contacto con una cantidad eficaz de autólogos, células adherentes no-CD8, CD14+ cargadas con péptido
 10 seleccionado, (p. ej. alrededor de una célula adherente no-CD8, CD14+ por cada cuatro células T naive estimulada-primaria). Preferiblemente, el tiempo de duración de IL-2/IL-7 y el contacto de la célula adherente CD14+ es de aproximadamente dos días y de aproximadamente tres a cuatro días, respectivamente, y cada reestimulación se repite en secuencia al menos una vez. Después de al menos dos regímenes de reestimulación, un régimen de expansión de células T no-específica comprende el contacto con IL-2 y anti-CD3 (p. ej. OKT®3) durante aproximadamente dos a cinco días.

15 **[0093]** En otras realizaciones preferidas, las células T autólogas CD4+ auxiliares e IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, o IL-21 se ponen en contacto con las células T naive antes de, concomitante con, o después de la estimulación primaria o la re-estimulación. Preferiblemente IL-2 se utiliza en combinación con al menos una de IL-7, IL-15 o IL-21. Cuando se utiliza IL-15, se prefieren cantidades eficaces de IL-15 son aproximadamente 1-100 ng/ml y preferentemente, 1, 10, 20, 25, 40, or 50 ng/ml IL-15. Similarmente cuando se utiliza IL-21, se prefieren cantidades eficaces de IL-15 son aproximadamente 1-100 ng/ml y preferentemente, 1, 10, 20, 25, 40, or 50 ng/ml IL-21. En tales formas de realización preferidas, las células T naive se pueden dirigir para convertirse en células T de memoria. Tal régimen de la célula T CD4+ auxiliar puede emplearse en adición de o en lugar de cualquiera de los
 20 procedimientos de expansión o de reestimulación de la célula T no-específicas descritas anteriormente, haciendo que las células T de memoria pueda tolerar múltiples rondas de re-estimulación *ex vivo*. Además, un producto de terapia celular que contiene tales células T de memoria, cuando es administrada a un sujeto, puede entonces ser expandida y estimulada *in vivo* cuando se encuentra con el péptido seleccionado y otras señales de activación. Procesos en general en relación con la preparación de células T auxiliares y su incorporación en IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, y/o IL-21 estimulación o expansión de las células T naive asistida para convertirse en células T de memoria o en los CTL pueden encontrarse en p. ej. U.S. Patent Application Publication No. 2002/0119121 and International Publication No. WO 2002/022648.

30 **[0094]** Con el fin de tratar a un sujeto, un producto de terapia celular se administra preferiblemente al sujeto del que se obtuvo originalmente el producto de aféresis usado para preparar el producto de terapia celular. Por lo tanto, un sujeto que es tratado con un producto de terapia celular se le administra preferiblemente un producto de terapia celular que contiene células T autólogas activadas, y más preferiblemente que contenga los CTL.

35 **[0095]** Los ejemplos de enfermedades, trastornos o condiciones que pueden ser tratadas con un producto de terapia celular incluyen, por ejemplo, trastornos del sistema inmune, tales como trastornos de inmunodeficiencia, trastornos autoinmunes, trastornos relacionados con el sistema inmune comprometido, insuficiente o ineficaz o respuesta inmune del sistema; infecciones, tales como infecciones virales, infecciones bacterianas, infecciones por micoplasma, infecciones por hongos y las infecciones parasitarias; y cánceres, tales como melanoma maligno, mieloma múltiple, cáncer de próstata, linfoma, linfoma no-Hodgkin, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, el linfoma de Burkitt, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, glioma, y tumor cerebral.

45 **[0096]** El tratamiento de una enfermedad, trastorno, o condición con un producto de terapia celular puede ocurrir antes, concomitante con, o después de otro tratamiento con otros productos terapéuticos o regímenes. Ejemplares adicionales de regímenes, componentes o modalidades que pueden ser usados en conjunción con la administración del producto de terapia celular de la invención incluyen, por ejemplo: inmunoestimulador, inmunosupresores y otros regímenes de inmunoterapia, tales como citocinas, linfocinas, quimioquinas, interleuquina, o la administración de interferón; lymphodepleting y mieloablativo regímenes, como Diftitox Denileukin (DAB- IL2) o la administración de cladribina; y tratamientos tradicionales de quimioterapia y radiación. En realizaciones preferidas, un régimen de tratamiento lymphodepleting, tal como el descrito en U.S. Provisional Application No. 60/778,516, se emplea en conjunción con el tratamiento del producto de terapia celular.

55 **[0097]** De acuerdo con ello, las células T naive ventajosamente pueden obtenerse de un sujeto que padece una afección o enfermedad tratable con el producto de terapia celular antes de la iniciación de otro tratamiento o terapia que pueda interferir con, atenuar, o limitar la activación de las células T naive. Por ejemplo, en el tratamiento de un individuo con una neoplasia o tumor, un producto de aféresis linfática que comprende células T naive puede obtenerse antes de la iniciación de la quimioterapia o tratamiento de radiación y se mantenerse en cultivo. Las células T naive pueden entonces activarse de acuerdo con la presente invención, proporcionando con ello un
 60 producto de terapia celular, que puede ser infundido en el sujeto antes de, concomitante con, o después de otros regímenes de tratamiento.

65 **[0098]** Otras realizaciones, características y ventajas de la invención se ilustran adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

MATERIALES

5 Péptido tirosinasa - YMNGTMSQV (SEQ ID NO.5).

10 **[0099]** Un péptido tirosinasa (tyr 369-377), correspondiente a los aminoácidos 369-377 de la tirosinasa humana, es fabricada y purificada utilizando los estándares de cumplimiento GLP (Synpep Corporation). El polvo de péptido tal como se recibió del fabricante (Synpep Corporation) se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) para lograr una solución stock de péptido a una concentración de 10 mg/mL y se almacena de -72 °C a -88 °C antes de su uso. Esta solución stock de péptido se mezcla en partes iguales con otras soluciones stock de péptido (también a una concentración de 10 mg/ml) para generar soluciones de péptidos combinados para usar en la carga de las xCPA. Las soluciones de péptidos combinados se dividen en partes alícuotas en viales estériles en una sala limpia clase 10.000 en condiciones asépticas en una cabina de bioseguridad de clase II.

15 Péptido tirosinasa - YMDGTMSQV(SEQ ID NO.6)

20 **[0100]** Una forma desamidada del péptido tyr 369-377 se describe anteriormente, el cual contiene un residuo de ácido aspártico en lugar de un residuo de asparagina en la posición tres del péptido, se fabrica y se purifica utilizando las normas de cumplimiento GLP (Synpep Corporation). Esta forma se llama desaminación Tyr 369-377d. El polvo de péptido recibido del fabricante se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) para lograr una solución stock de péptido a una concentración de 10 mg/mL, y se almacena de -72 °C a -88 °C antes de su uso.

25 MART-1 Péptido - AAGIGILTV (SEQ ID NO.9)

30 **[0101]** Un péptido de MART-1 (MART-1 27-35), correspondiente a los aminoácidos 27- 35 de MART-1 humano, es purificada y fabricada utilizando los estándares de cumplimiento GLP (Synpep Corporation). El polvo de péptido se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) para lograr una solución de péptido a una concentración de 10 mg/mL, y se almacena de -72 °C a -88 °C antes de su uso. gp100 Péptido- ITDQVPFSV (SEQ ID NO.7)

35 **[0102]** Un péptido gp100 (gp100 209-217), correspondiente a los aminoácidos 209-217 de humano gp-100, es fabricada y purificada utilizando los estándares de cumplimiento GLP (Synpep Corporation). El polvo de péptido se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) para lograr una solución stock de péptido a una concentración de 10 mg/mL, y se almacena de -72 °C a -88 °C antes de su uso.

40 gp100 Péptido - KTWGQYWQV (SEQ ID NO.70)

45 **[0103]** Un péptido gp100 (gp100 154-162), correspondiente a los aminoácidos 154-162 de humano gp100, es purificada y fabricada utilizando los estándares de cumplimiento GLP. El polvo de péptido tal como se recibió de Synpep Corporación se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) para lograr una solución stock de péptido a una concentración de 10 mg/mL, y se almacena de -72 °C a -88 °C antes de su uso.

50 gp100 Péptido - YLEPGPVTA (SEQ ID NO.8)

55 **[0104]** Un péptido gp100 (gp100 280-288), correspondiente a los aminoácidos 280-288 de gp100 humana, es purificada y fabricada utilizando los estándares de cumplimiento GLP por Synpep Corporation. El polvo de péptido se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) para lograr una solución de péptido a una concentración de 10 mg/mL, y se almacena de -72 °C a -88 °C antes de su uso.

60 **[0105]** Cada uno de los péptidos antes mencionados, así como el péptido CD8 cadena alfa (AAEGLDTQRFSG; SEQ ID NO.83) descritos arriba fueron generados de acuerdo con el método de Merrifield (Merrifield, J. American Chemical Society, Vol 85, pp 2149- 2154 (1963)) usando BOC-chemistry en ABI # 430 (HOBt-DCC chemistry) o ABI # 431 (HBT chemistry) sintetizadores de péptidos. La escisión de péptidos protegidos de la resina fue realizado con 90% de fluoruro de hidrógeno y 10% anisol a -4 °C durante una hora. Los péptidos fueron purificados por HPLC C18 de fase inversa usando una mezcla de ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA) en H₂O y 0,1% de TFA en acetonitrilo. Los péptidos purificados fueron analizados por HPLC analítica junto con electrospray espectrometría de masas y por análisis de aminoácidos. Estos péptidos fueron utilizados como sales de trifluoroacetato.

65 Set de tubos desechables Isolex 300i

El Set de tubos desechables Isolex 300i es de un solo uso, estéril, no pirogénica, sistema cerrado de vía de fluido (Baxter) se utiliza con el sistema magnético de selección de células (Isolex 300i), y es almacenado a temperatura ambiente (RT) antes de su uso. Contiene un conjunto de membrana de hilado, bolsas de transferencia, colectores de tubos, bolsas de recogida, contenedores de separación primaria y secundaria, y tubos para permitir conexiones

asépticas. El set de tubos desechables ISOLEX se esterilizan por irradiación gama.

Cadena Alfa Péptido CD8 - AAEGLDTRFSG (SEQ ID NO.83)

5 **[0107]** La cadena ligera alfa de péptido CD8 (AAEGLDTRFSG; SEC ID NO.83) es purificada y fabricada bajo los estándares de cumplimiento GLP. La cadena ligera alfa de péptido CD8 se utiliza en los procesos de aislamiento de células T CD8+ para liberar células T CD8+ capturadas usando un anticuerpo anti-CD8 (37B1A) y el Sistema Magnético de Selección de Células Isolex 300i . Cada lote de péptido es fabricado por Synpep Corporation para cumplir con los estándares de calidad farmacéutica, y es probado para la secuencia, la pureza, el peso molecular, y la apariencia del péptido. La cadena ligera alfa de péptido CD8, recibido como un polvo, se procesa adicionalmente para crear una solución stock de 10 mg/ml. Esta solución stock es diluida en DPBS, es filtrada a través de un filtro de 0.2- μ m, es dividido en alícuotas viales estériles y es almacenada de -72 ° C a -88 ° C antes de su uso. La colocación de un vial de reactivo peptídico es realizada en una sala limpia clase 10.000 en condiciones asépticas en una cabina de bioseguridad de clase II.

15 Tampón Fosfato Salino Dulbecco (DPBS), 1X concentration

[0108] Se almacena una solución tampón fosfato salino de Dulbecco, estéril, no-pirogénico (DPBS) (Invitrogen Corporation) a temperatura ambiente antes de su uso. DPBS se utiliza para los siguientes procedimientos: funcionamiento del sistema de selección celular magnética Isolex 300i durante la selección de las células T CD8+ y células T CD8; el lavado de las células no-adherentes durante las etapas de reestimulación y el lavado del anticuerpo monoclonal no unido OKT3 durante la expansión no específica; y la dilución de β 2 microglobulina humana, IL-7, péptido CD8, y OKT3.

25 Solución anticoagulante citrato de sodio

[0109] Se almacena una solución anticoagulante de citrato de sodio estéril, no pirogénica, USP (Baxter Fenwal), a temperatura ambiente (RT) antes de su uso. La solución de citrato de sodio se utiliza como un tampón aditivo para ejecutar el Sistema de Selección Magnética Isolex 300i para la selección de las células T CD8+ y células T CD8.

Frascos T-75 sin airear

35 **[0110]** Se utilizan frascos T-75 sin airear para el cultivo de células huésped y de las xCPA. Los frascos de cultivo de células tratadas tienen un área de superficie de 75 cm² y son estériles, no pirogénico, y hechos de un material de poliestireno claro. Los frascos T-75 se esterilizan mediante radiación gamma y se certifican para cumplir con la garantía de esterilidad de 10⁻⁵ y la presencia de pirógenos a < 0,5 EU/mL. Los frascos T-75 se almacenan a temperatura ambiente cuando no están en uso.

40 Medio *Drosophila* de Schneider (concentración 1X)

[0111] Medio *Drosophila* de Schneider es un medio de cultivo utilizado para el cultivo de células de *Drosophila*. Cada lote de medio se prueba por el proveedor (Invitrogen Corporation) molaridad, pH, esterilidad, y la capacidad de sostener el crecimiento de células de *Drosophila*. El medio *Drosophila* de Schneider se almacena de 2 ° C a 6 ° C antes de su uso.

Geneticina (G418) (50 mg/mL)

50 **[0112]** Geneticina (Invitrogen Corporation) es un antibiótico selectivo utilizado en el cultivo de células de *Drosophila* para el mantenimiento de la expresión de moléculas exógenas codificadas por el ácido nucleico xenogénico. Geneticina se suministra como una solución madre estéril, y se almacena de 2 a 6 ° C antes de su uso.

HYQ SFX Medio de insecto (1X concentración)

55 **[0113]** Medio para insecto Hyclone SFX (Hyclone Corporation) es un medio de cultivo libre de suero utilizado durante la carga de péptido de los xCPA, y se almacena a 2 ° C a 6 ° C antes de su uso. Este medio no contiene productos de origen bovino.

60 Cobre (II) pentahidratado de sulfato (CuSO₄)

[0114] El sulfato de cobre pentahidrato se usa para la inducción de células huésped modificadas para expresar HLA humano, co-estimuladoras, y moléculas de adhesión. El reactivo se recibe como un polvo cristalino. La solución stock se formula mediante la disolución de CuSO₄ en la endotoxina libre agua estéril para conseguir una concentración de 200 mM y filtrar la solución asépticamente a través de un filtro de 0,2- μ m en

un recipiente estéril en una cabina de bioseguridad de clase II. La solución stock filtrada se almacena de 2 °C a 6 °C antes de su uso.

Cloruro de calcio hidratado (1M)

5 **[0115]** El cloruro de calcio hidratado se utiliza para la coagulación de plasma autólogo obtenido a partir del producto aféresis linfática para generar suero autólogo utilizado en los procesos de aislamiento o de activación de células T CD8+. Se recibe el cloruro de calcio hidratado como un polvo cristalino, se agrava en una solución stock, y es almacenada de 2 °C a 6 °C antes de su uso. La solución stock es formulada mediante la disolución de cloruro de calcio en agua asépticamente estéril libre de endotoxinas y filtrada a través de un filtro 0,2-mm en un recipiente estéril en una cabina de bioseguridad de clase II.

Agua destilada

15 **[0116]** EL agua destilada del cultivo de células, el cual se obtiene por la membrana de filtrado y la endotoxina de detección (Invitrogen Corporation), se utiliza como disolvente para la preparación de soluciones stock de sulfato de cobre, cloruro de calcio, y la interleucina-2 (IL- 2) y es almacenada a temperatura ambiente antes de su uso.

Ácido acético (17.4M)

20 **[0117]** El ácido acético utilizado para la preparación de soluciones stock de IL-2 se obtiene de Sigma Corporation y se almacena a temperatura ambiente antes de su uso.

FICOLL-PAQUE[®] Plus (1X concentración)

25 **[0118]** Después del aislamiento de las células T CD8 + y células CD8 T con el sistema de selección celular magnética Isolex 300i, la fracción de las células mononucleares de la no-CD8 + son fraccionadas adicionalmente utilizando Ficoll-Paque[®] Plus, un reactivo de Ficoll sin componentes de origen animal disponible de Amersham Pharmacia Biotech utilizado para eliminar las células muertas, neutrófilos, y células rojas de la sangre. El reactivo se almacena a temperatura ambiente antes de su uso. PENTASPAN[®] (1X concentración) PENTASPAN[®] (B. Braun Medical Inc) es una solución estéril de 10% de pentastarch en cloruro de sodio al 0,9% para uso clínico (NDC 0264-1972-10), y se almacena a temperatura ambiente antes de su uso. Se utiliza como un crioprotector en la criopreservación de las células CD8 T aisladas y células T CD8+.

35 Sulfóxido de dimetilo (DMSO), 1X concentración

[0120] DMSO se usa como crioprotector en la criopreservación de las células CD8 T aisladas y células T CD8+. La solución de DMSO, disponible de Sigma-Aldrich, se almacena a temperatura ambiente antes de su uso.

40 Medio de cultivo RPMI (1X concentración)

[0121] El medio de cultivo RPMI (Invitrogen Corporation), el cual es un suero y libre de antibiótico, se utiliza para cultivar células T. El medio de cultivo RPMI se almacena de 2 a 6 °C antes de su uso.

45 L-Glutamina (200mM; 100X concentration)

[0122] L-Glutamina (USP), 200 mM, disponible de Invitrogen Corporation, se utiliza como suplemento de medio de cultivo RPMI, y se almacena a -80 °C antes de su uso.

50 Solución de piruvato sódico MEN (100 mM; 100X concentración)

[0123] Solución piruvato de sodio MEM (100 mM), disponible de Invitrogen Corporation, se utiliza para complementar medio RPMI, y se almacena de 2 a 6 °C antes de su uso.

55 Aminoácidos no- esenciales (10mM; 100X concentración)

[0124] Aminoácidos no-esenciales de Invitrogen Corporation utilizados para complementar medio RPMI se almacenan de 2 a 6 °C antes de su uso.

60 Solución tampón HEPES. (1M; 200X concentración)

[0125] Solución tampón HEPES (Invitrogen Corporation), utilizado para complementar medio RPMI, se almacena de 2 °C a 6 °C antes de su uso.

65 Frascos T-75 - Aireados

[0126] Frascos T-75 aireados se utilizan en la estimulación y la re-estimulación de células T CD8+.

Los frascos de cultivo de células tratadas tienen una superficie de 75 cm², son estériles, no pirogénicos, y hechos de un material de poliestireno claro. Los frascos se almacenan a temperatura ambiente antes de su uso. Cada frasco tenía un tapón de polietileno aireado con un orificio de ventilación de aire hidrófobo PTFE 0.2-mm. Los frascos T-75 son esterilizados por irradiación gama.

Medio celular X-Vivo 10 (1X concentración)

[0127] El medio de cultivo de células X-vivo 10, suministrado por BioWhittaker, se almacena de 2 °C a 6 °C antes de su uso. Este medio, que es un suero, al rojo fenol y libre de antibióticos, se utiliza durante la fase de expansión no específica de las células T activadas por la exposición a los xCPA cargadas con péptido.

Medio de Leibovitz L-15 sin glutamina(1X concentración)

[0128] Medio de Leibovitz L-15 (sin L-glutamina), un medio de cultivo celular disponible de Sigma-Aldrich, se almacena de 2 °C a 6 °C antes de su uso durante los pasos de carga de péptido en el proceso de activación de células T.

Frascos T-225 - Aireados

[0129] Frascos T-225 aireados se utilizan en estimulación OKT@3 de células T durante la expansión celular de las células T no-específicas. Los frascos de cultivo de células tratadas tienen una superficie de 225 cm², están hechos de un material de poliestireno claro, esterilizados por irradiación gama. Cada frasco tiene un tapón de polietileno aireado con un orificio de ventilación de aire hidrófobo PTFE 0,2-mm. Los frascos se almacenan a temperatura ambiente antes de su uso.

Bolsas de cultivo de tejido LifeCell 3-litros

[0130] Bolsas estériles de un solo uso LifeCell con capacidad de 3000mL se almacenan a temperatura ambiente antes de su uso.

Inyección de Cloruro Sódico 0,9%

[0131] Solución de cloruro sódico 0,9%, USP, disponible de Baxter Fenwal Laboratories, se utiliza para procedimientos de lavado de células durante la recolección de las células T. La solución, que es estéril, no pirogénico, y libre de componentes animales, se almacena a temperatura ambiente antes de su uso.

Dextrosa 5% y solución de cloruro sódico 0,9%.

[0132] Solución inyectable de dextrosa de 5% y cloruro sódico de 0,9%, USP (Baxter Fenwal Laboratories), se obtiene como una solución estéril, no pirogénico libre de componentes animales. La solución, la cual es utilizada como un tampón de almacenamiento para las células T activadas, se almacena a temperatura ambiente antes de su uso. Solución láctica de

Ringer 0,9%

[0133] Solución láctica de Ringer 0,9%, USP (Baxter Healthcare Laboratories), que es una solución estéril, endotoxina-baja de cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio y lactina de sodio en agua para inyección (libre de componentes de origen animal), se almacena a temperatura ambiente antes de su uso en la cosecha y suspensión de células T.

Bolsa de producto final

[0134] Las bolsas de productos finales utilizados para contener las células T activadas y procesadas son de un solo uso, las bolsas de infusión estériles con una capacidad de 1000 mL compuestas de plástico biocompatible. Las bolsas se almacenan a temperatura ambiente antes de su uso y disponible de los laboratorios Baxter Fenwal.

Cryotubes NUNC® 1,8 mL

[0135] Los criotubos NUNC® (1,8 mL) puede ser usados para congelar las células huésped, las xCPA, y las células excedentes T CD8+ generadas durante el proceso de activación.

Linfocitos humanos de sangre periférica

[0136] Los productos de aféresis linfática se recogen de sujetos humanos diagnosticados con melanoma y se almacenan a temperatura ambiente antes de su uso para generar un producto celular específica del paciente, autólogos.

5 Suero autólogo humano

[0137] El suero autólogo humano se utiliza como una fuente de proteína para el cultivo de células T aisladas. El plasma autólogo humano se prepara a partir del producto de aféresis linfática mediante la adición de cloruro de calcio para lograr la coagulación de la fibrina y luego recoger la fase de suero líquido. La fase de suero líquido recogido se almacena a 4 °C para un corto plazo y a -80 °C para el almacenamiento a largo plazo.

Banco maestro de células *Drosophila*

[0138] Una línea de las xCPA de *Drosophila* derivada del clon B xenogénico de *Drosophila*, el cual se utiliza como stock de semillas para crear un cultivo continuo de XCPA de *Drosophila*, se obtiene como se describe a continuación.

Suero fetal bovino

[0139] El suero bovino fetal (FBS), el cual se utiliza como fuente de proteínas para el crecimiento de células huésped o células xCPA, se almacena a -80 °C. El FBS, disponible en Gemini Bioproducts, se procesa a partir de la sangre fetal bovina procedente de animales de origen estadounidense. Los animales maternos de los que deriva la sangre están libres de enfermedades infecciosas y contagiosas, y parásitos perjudiciales.

25 Anticuerpo monoclonal Anti-CD8 (37B1A), 10.0mg/mL

[0140] Anti-CD8(37B1A) es un anticuerpo monoclonal murino (mAb) dirigido contra el antígeno CD8 de las células T, es utilizado para seleccionar las células T CD8+ con el Sistema de Selección Celular Magnética Isolex 300i. La solución concentrada se diluye en DPBS estériles para usar en procesos de aislamiento de células o de activación T CD8+. La solución a granel se filtra a través de un filtro de 0,2-µm y luego se divide en alícuotas en viales de un solo uso en una sala limpia clase 10.000 en condiciones asépticas en una cabina de bioseguridad de clase II. Las alícuotas se almacenaron a -80 °C antes de su uso.

[0141] El anti-CD8 (37B1A) mAb se generó mediante la fusión de los esplenocitos de ratón libres de patógenos Harlan Sprague Dawley Balb/c inmunizado con un péptido de cadena ligera alpha CD8 (AAEGLDTQRFSG; SEQ ID NO.83) con línea celular no-secretora de mieloma P3X63Ag8.653 (American Type Culture Collection CRL-1580). Un informe de Anmed/Bi-osafe, Inc. indicó que la línea de células CRL-1580 dio negativo para la presencia de virus murinos indígenas y micoplasma. Los hibridomas se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal definido inactivado por calor (Hyclone SH 30070, lote AJA9530) el cual fue negativo para bacterias, hongos, virus y micoplasma. El clon 37B1 fue seleccionado por su capacidad de producir un anticuerpo que tiñe las células CD8+ humanas (evaluada por citometría de flujo). Este hibridoma fue posteriormente subclonado mediante una técnica de dilución limitante. Un subclón, 37B1 A, fue ampliado, congelado y almacenado a -140 °C.

[0142] Para generar el 37B1 A mAb purificado, una parte alícuota de células congeladas se descongeló y expandió en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal. definido. El porcentaje de suero en el medio se redujo progresivamente y las células se adaptaron al cultivo en el medio libre de suero (Gibco-BRL 12045-076). La escalada de células se logró en un dispositivo de fibra hueca (Cellmax), siguiendo las instrucciones del fabricante. El crecimiento de las células se consigue utilizando el mismo medio libre de suero (Gibco-BRL 12045-076, lote 1066388) que se utiliza para la adaptación. El medio acondicionado se recogió y el anticuerpo monoclonal se purificó por cromatografía columna de flujo rápido en una proteína G con Sepharosa 4 (Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células utilizadas para la escalada confirmaron que eran micoplasma negativo cuando fueron probadas por el método de PCR-ELISA (Boehringer-Mannheim cat. No. 1 663 925). El anticuerpo se eluyó de la columna de la proteína G con un tampón de pH bajo (0,1 M citrato, pH 3,0) y después se neutralizó mediante la adición de Tris base. El anticuerpo purificado con proteína G después fue inactivado por calor a 56 °C durante 30 minutos.

[0143] Contaminantes de alto peso molecular, tales como anticuerpos agregados, se eliminaron por filtración en gel en Sephacryl S300 de alta resolución (Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante. 37B1A mAb se purificó adicionalmente por cromatografía de intercambio de iones en una columna de flujo rápido Q Sepharose (Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la cromatografía de intercambio iónico, 37B1A mAb purificada, se dializó contra el tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS), se esterilizó por filtración de membrana (filtro 0.2 µm), se ajustó a una concentración de 10,0 mg/ml mediante la adición de DPBS estériles, y se congeló en alícuotas almacenadas a -80 °C.

[0144] El stock de células de hibridoma 37B1A fueron probadas y resultaron negativas para los agentes

retrovirales. Además, para asegurar la ausencia de micoplasmas, bacterias y endotoxinas, la prueba se llevó a cabo en cada lote de anticuerpos monoclonal murino anti-CD8 utilizado en preparaciones clínicas. Los lotes 37B1A mAb prurificados se prueban para la pureza (SDS-PAGE), la esterilidad, contenido de endotoxinas (LAL cromogénico), la contaminación por micoplasmas (PCR ELISA) y afinidad celular CD8+ humanos (citometría de flujo).

5

DYNABEADS® M-450 Oveja Anti-IgG de ratón (SAM) IgG

[0145] DYNABEADS® M-450 (SAM) IgG son perlas paramagnéticas estériles recubiertas con anti-IgG de ratón policlonal de oveja que se unen al IgG principal del ratón. DYNABEADS® disponible en Baxter Oncology Inc, se almacenan a 4 °C antes de su uso en el aislamiento de células T mediante el Sistema de Selección Celular Magnética Isolex 300i.

10

Beta-2 Microglobulina humana recombinante (β2M)

15

[0146] Beta-2 microglobulina humana (β2M) es una proteína plasmática humana producida mediante tecnología de ADN recombinante que se recibe como un concentrado y después se diluye en DPBS estériles para alcanzar una concentración de 1,0 mg/mL. La solución a granel se filtra a través de un filtro de 0.2-mm, se divide en alícuotas en viales estériles y se almacenan a - 80 °C antes de usar durante la preparación y la carga de péptido de las xCPA y la carga de péptido de células adherentes.

20

Interleucina-7 (IL-7) humana recombinante, 30.000 U/mL (1.000X concentración)

[0147] La interleucina-7 (IL-7) humana recombinante es una linfocina producida en *E. coli* y purificada por el proveedor (Pepro-Tech) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), pero no anticuerpos. La IL-7, se recibe como un polvo, se diluye en DPBS estériles que contienen 1% de albúmina de suero humano. La solución a granel se filtra a través de un filtro de 0.2-mm, alícuotas en viales estériles y almacenadas a - 80 °C antes de su uso.

25

Interleucina-2 (IL-2) humana recombinante (Proleukin®), 20.000 U/mL (1.000 X concentración)

30

[0148] La interleucina-2 (IL-2) humana recombinante es una linfocina aprobada para uso clínico producido por tecnología de ADN recombinante y suministrado por Chiron Corporation. La IL-2, se recibe como un polvo, se diluye en IL-2 diluyente (0,5% de albúmina de suero humano en 50 mM de ácido acético), es filtrado a través de un filtro de 0,2 mm, se divide en alícuotas en viales estériles, y después se almacena a - 80 °C antes de su uso.

35

Orthoclone OKT®3 Solución estéril, 1.0 mg/mL(OKT3)

[0149] Orthoclone OKT®3, un anticuerpo monoclonal murino específico para el antígeno CD3 de células T suministrados en ampollitas como una solución estéril aprobado para uso clínico (disponible en Ortho Biotech), se divide en alícuotas en viales de un solo uso, en condiciones estériles y se almacenan congeladas a - 80 °C antes de usar en la activación de células T. Información sobre los productos OKT3, incluyendo dosis y administración así como referencias de los métodos de preparación, se proporcionan, por ejemplo, Reinherz et al., *Cell*, 19(4):821-827 (1980); Chatenoud et al., *J. Immunology*, 137(3):830-838 (1986); and Physicians' Desk Reference, pp. 1553-1554 (1990).

45

25% Albúmina de suero humano (HSA)

[0150] 25% HAS, USP (Baxter Fenwal Laboratories; la fuente de plasma para cada lote puesto a prueba es negativo para el VIH-1 VIH-2, VHC y VHB), se almacena a temperatura ambiente antes de su uso como fuente de proteína tamponada durante la siguiente preparación de células T y la activación de los pasos: purificación de células T CD8+ y células CD8 T; carga de péptido de células adherentes; y la formulación final de las células T activadas. PREPARACIÓN DE LAS CPAA

50

Líneas celulares derivadas de las CPAA

55

[0151] Las líneas de CPA xenogénica se generaron a partir de células Schneider (células SC2), que fueron establecidas originalmente en 1969 de varios cientos de 20 a 24 horas de edad, embriones Oregon-R (tipo salvaje) *Drosophila melanogaster* (Oregon-R) (American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1963) de acuerdo con procedimientos publicados (Schneider, *J. Embryol. Morph.* 27: 353-365, 1972), y depositado en la ATCC (CRL10974). Con el fin de generar las xCPA, las células S2 fueron transfectadas con los vectores derivados del vector plásmido pRmHa-3 (véase U.S. Patent No. 6,225,042 respecto a la construcción y el uso de vectores de plásmido pRmHa). Una línea de xCPA, designado aquí como clon A, se transfectó con vectores que codifican HLA-A2.1 de clase I, B7.1 e ICAM-1. Una segunda línea de xCPA, designado aquí como clon B, se transfectó con vectores que codifican HLA-A2.1 de clase I, B7.1, B7.2, ICAM-1, y LFA-3. Una tercera línea celular de xCPA, designado aquí como clon C, se transfectó con vectores que codifican HLA-A2.1 de clase I, B7.1, ICAM-1, LFA-3 y CD70. Por lo tanto, el clon A expresa HLA-A2, B7.1 e ICAM-1, el clon B expresa HLA-A2.1 de clase I, B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA-3, y el clon C expresa HLA-A2.1 clase I, B7.1, ICAM-1, LFA-3, y CD70. B7.2 y LFA-3.

60

65

Mantenimiento de la línea celular de la CPAA, inducción y carga de péptido

5 [0152] Los cultivos continuos independientes del clon A y las células del clon B descendiente se mantuvieron en medio de Schneider suplementado con 10% de suero fetal de ternera y 500 mg/ml de geneticina (G418), y se dividieron dos veces a la semana con medio fresco añadido durante cada división para ajustar densidad celular de aproximadamente 1 x 10⁶ células/mL. Aproximadamente un día antes de la inducción (día -2- a -4; el día 0 se define como el día donde se ponen a prueba las células para la expresión de moléculas exógenas y se cargan con el péptido), 3 frascos x T-75 se inocularon con un volumen de suspensión celular mantenidos en cultivos de stock equivalentes a 1,5 x 10⁷ células/frasco. Se añadió medio completo Drosophila-SFM sin G418 para llevar el volumen hasta 15 ml/frasco. Los frascos se incubaron después en una cámara a aproximadamente 27 °C. En el día -1 a -3 aproximadamente, las células se indujeron por adición de sulfato de cobre (CuSO₄) a una concentración final de 1,0 mM (1: 200 dilución de stock 200 mM de CuSO₄; 75 µl de CuSO₄ para cada frasco T75 conteniendo 15 ml de suspensión de células) y devuelto a la cámara de 27 °C. El tiempo de inducción duró aproximadamente de 15 24 a 72 horas.

[0153] En el Día 0, los frascos que contenían cultivos de células inducidas fueron comprobados visualmente y microscópicamente para la evidencia de contaminación. Los frascos no contaminados se agruparon y las células viables fueron contadas. Las muestras de cultivos de células agrupadas de aproximadamente 6 x 10⁶ células fueron evaluadas por citometría de flujo utilizando el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia asistida (FACS) para determinar el nivel de expresión de moléculas exógenas. Los cultivos de células (aproximadamente 1 x 10⁷ células/mL) luego fueron probadas para verificar la expresión exógena de HLA-A2.1, B7.1 e ICAM-1 (para células clon A) o HLA-A2.1, B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA-3 (para células clon B) antes de la carga del péptido. Una vez que la expresión de moléculas exógenas se verificó, cada cultivo celular se lavó mediante el fraccionamiento de cada cultivo en dos tubos cónicos de 50 ml estériles. A continuación, cada tubo se llenó con medio HYQ SFX de insecto y se centrifugó a 1700 rpm (600 x g) durante aproximadamente siete minutos para sedimentar las células. Los sobrenadantes fueron descartados, y los tubos que contenían sedimento de células se centrifugaron de nuevo a 1700 rpm (600 x g) durante aproximadamente un minuto. Los sobrenadantes se retiraron con una pipeta de punta fina. Los sedimentos de cada cultivo de células de división se recombinan y se vuelven a suspender en 8 mL de medio de insectos SFX a una densidad celular de aproximadamente 1 x 10⁷ célula/mL. Aproximadamente 40 mL de solución stock de β2 microglobulina a 1,0 mg/mL y 24 mL de 1:50 de una solución stock péptido combinado de 1,67 mg/mL para cada péptido fue añadido a cada cultivo que se resuspendió. Por lo tanto, cada suspensión de cultivo celular contenía β2 microglobulina a una concentración final de aproximadamente 5 mg/mL y cada péptido seleccionado para ser cargado en las XCPA a una concentración final de aproximadamente 0,1 mg/mL por péptido. Los cultivos celulares fueron incubados en la suspensión que contiene β2 microglobulina y péptidos durante al menos cuatro horas y no más de ocho horas, con agitación cada 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período de incubación del péptido, aproximadamente de 1-mL alícuotas de cada cultivo de células fueron distribuidas por separado en ocho tubos de polipropileno (Falcon 2006). Cualquier suspensión de cultivo celular residual fue desechado.

40 PROCEDIMIENTOS

Ejemplo 1: Caracterización de las xCPA de *Drosophila*

45 *Pruebas de microplasma y virus adventicios.*

[0154] Las pruebas se realizaron por BioReliance para micoplasmas y virus contaminantes. El banco de células madre de *Drosophila* xCPA se determinó que era libre de micoplasmas y virus adventicios de acuerdo con un panel de pruebas de seguridad estándar, como se indica en la Tabla I: Tal como se utiliza aquí, el término "esencialmente libre de contaminación" se refiere a cultivos celulares que son esencialmente libre de agentes contaminantes, incluyendo ácidos nucleicos, bacterias, virus y micoplasma, particularmente bacterias vivas, virus de infecciones y micoplasmas.

55 Tabla I: prueba de *Drosophila* xAPCs.

Objetivo	Test	Especificación
Contaminación microbiana	Micoplasmas	Negativo
	<i>In Vitro</i> (14 días y 42 días)	

65

(continuado)

	Objetivo	Test	Especificación
5	Virus adventicios	Indicador de líneas celulares: MRC-5 Vero	Negativo
10		<i>In Vivo</i> Ratones adultos y lactantes Conejillos de Indias Huevos	Negativo
15	Retrovirus	Microscopio electrónico de	Negativo
		Transcriptasa inversa	Negativo

20 **[0155]** No se detectaron contaminantes virales adventicios cuando la línea celular xCPA de *Drosophila* se inoculó en células indicadoras, y las células fueron observadas durante 14 días para el efecto citopático, hemadsorción y hemaglutinación. El tiempo de incubación del ensayo se extendió a un total de 42 días por lo que fue mayor que el tiempo de 31 días de cultivo *ex vivo* de células efectoras CD8+ durante la fabricación del producto de terapia celular que se describe a continuación. Los contaminantes virales adventicios no se detectaron en las xCPA de *Drosophila* durante el tiempo en este ensayo extendido que duró la incubación.

25 **[0156]** Co-cultivo de las xCPA de *Drosophila* con líneas indicadoras de insectos (*Drosophila melanogaster* y *Aedes albopictus*) resultó en la transmisión tanto de *Drosophila X* y HPS-1 como virus presentes en las xCPA de *Drosophila* a la línea de *Drosophila*, pero no a la línea de mosquito usado. Tanto las líneas de *Drosophila* y mosquito utilizadas como células indicadoras fueron positivas para nodavirus, por lo que es imposible evaluar la transmisión de nodavirus de las xCPA de *Drosophila* a las líneas de células indicadoras utilizadas.

Pruebas para la transcriptasa inversa retroviral.

35 **[0157]** Pruebas para confirmar la ausencia de la actividad transcriptasa inversa retroviral (RRT) se realizó en las xCPA *Drosophila* en BioReliance. La línea de xCPA se puso a prueba para detectar la presencia de Mn ++ - ++ y Mg - transcriptasa inversa retroviral dependiente. No se detectó evidencia de la presencia de estas transcriptasas inversas retrovirales.

40 **[0158]** Microscopía electrónica de transmisión (TEM) realizado en las xCPA de *Drosophila* por un laboratorio de servicio revelado la presencia de partículas similares al virus (VLP), en ambos núcleos (20/100 células, 40-45 nm de diámetro, que se asemejan Papovavirus) y el citoplasma (1/100, □30nm que se asemeja Nodavirus) de las células. Posterior al análisis TEM de los xCPA de *Drosophila* en otro laboratorio de servicio, no detectó partículas similares a retrovirus identificables; sin embargo, se observaron VLP con características consistentes con Reovirus en las células, pero no pudieron ser identificados positivamente. Debido a las discrepancias en los tipos de partículas virales identificadas por los dos laboratorios, las pruebas se repitieron utilizando muestras de ambos, de las xCPAs de *Drosophila* y de la línea celular madre Schneider S2 (SC2). Las células también fueron enviados a un tercer laboratorio de servicio. Los resultados de esta tercera evaluación mostraron que las tres líneas contenían los mismos tipos de partículas virales de los dos, o posiblemente de los tres tipos:

50 1) 30 nm de partículas grandes encontradas en el núcleo en el 90% de las células con cantidades que varían de <5 partículas/sección para gran acumulación de partículas que forman las matrices cristalinas. Las partículas eran más consistentes con un virus de la familia de parvovirus, el género densovirus, también conocido para infectar líneas de células de insectos;

55 2) 50 nm partículas grandes encontradas exclusivamente en el citoplasma. Aunque son más difíciles de detectar, estas partículas fueron menos frecuentes que la primera. Eran densas de electrónes y también se formaron matrices cristalinas en el citoplasma. Eran posibles partículas Reovirus replicadas en el citoplasma, y conocidas por infectar líneas de células de insectos; y

60 3) 15~20nm de partículas grandes densas de electrónes en el citoplasma de algunas de las células observadas, se cree representa a cualquiera de las estructuras celulares de la acumulación de proteínas virales o partículas posiblemente Nodavirus similares.

65

[0159] La presencia de los mismos VLP en la línea parental obtenido de la ATCC indicó que estaban presentes antes del establecimiento de las líneas xCPA. El análisis TEM reveló VLP tanto en el núcleo como en el citoplasma de la línea 2 de células de *Drosophila*. Las partículas estaban presentes en la mayoría de secciones de las células, aunque el número visto varió de una sola partícula a grandes agregados, similares a los resultados reportados anteriormente para clones SC2 y la línea de xCPA de *Drosophila*. Las células crecieron vigorosamente a pesar de la presencia de las partículas, y la naturaleza de la relación de las partículas a la célula se mantuvo desconocida en ese momento. Un resumen de las pruebas y de los resultados obtenidos en el análisis de la línea de *Drosophila melanogaster* patente SC2, y dos líneas de xAPC *Drosophila* se resumen en la Tabla II:

Tabla II:

Análisis de SC2, línea A xAPC, y línea B xAPC			
Test	SC2	<i>Drosophila</i> línea A APC	<i>Drosophila</i> línea A APC
Micoplasmas	ND ¹	Negativo	Negativo
TEM ²	Positivo para VLPs ³	Positivo para VLPs	Positivo para VLPs
Actividad RRT ⁴	ND	ND	Negativo
Contaminantes virales (<i>in vitro</i>) ⁵ 14 días de ensayo	ND	Negativo	Negativo
Contaminantes virales (<i>in vitro</i>) ⁵ 42 días de ensayo	ND	Negativo	ND
Contaminantes virales (<i>in vivo</i>) ⁶	ND	ND	Negativo
Test	SC2	<i>Drosophila</i> línea A APC	<i>Drosophila</i> línea A APC
¹ no determinado ² Microscopio electrónico de transmisión ³ Partículas como-virus (identificada como densovirus y reovirus por estructura, tamaño y localización) ⁴ Actividad transcriptasa inversa retroviral ⁵ Ensayo para la detección de contaminantes virales adventicios sobre líneas celulares indicadoras cuando los artículos de prueba son inoculados ⁶ Ensayo para la detección de virus, que no provocan un efecto perceptible en sistemas de cultivo celular			

[0160] La línea A de la xCPA de *Drosophila* se eligió para una caracterización adicional y usada como una xCPA en el resto de los ejemplos. Por consiguiente, la línea A de la xCPA de *Drosophila* se denominará más adelante como xCPA de *Drosophila*, o xCPA, a continuación.

Aislamiento y caracterización de partículas similares a virus de la línea A de la xCPA de Drosophila

[0161] Los VLP se sedimentaron a partir del lisado de la xCPA de *Drosophila*, y se purificaron por centrifugación de equilibrio en gradientes de densidad de CsCl. Los VLP anillados en densidades de 1,30 g/mL, 1,36 g/mL, y 1,41g/mL. Partículas purificadas se analizaron por microscopía electrónica, SDS/PAGE, extracción de ácidos nucleicos y secuenciación. Tinción negativa de estas fracciones, seguido por microscopía electrónica de transmisión dirigida a la observación de tres tipos de partículas en las fracciones:

- 1) La fracción en densidad 1,41 consistía en partículas no-envueltas, icosaédricas de aproximadamente 42 nm de diámetro. Esas partículas fueron consistentes con las partículas observadas en el núcleo de las células y se cree que es densovirus-similar;
- 2) la fracción a una densidad de 1,36 consistía en partículas no-envueltas de aproximadamente 30 nm de diámetro, y se confirmó que las estructuras observadas en el citoplasma de algunas células no eran resultado de la acumulación de proteínas virales, sino más bien de la acumulación de partículas, muy probablemente de la familia Nodaviridae; y
- 3) la fracción en densidad 1,30 consistía en partículas no-envueltas, icosaédricas de aproximadamente 42 nm de diámetro idéntico al de las partículas de densidad 1,41. Además, se encontraron unas pocas partículas icosaédricas de mayor tamaño (60 nm) en esta fracción y fueron consistentes con las partículas observadas en el citoplasma de las células y se cree que es reovirus-similar.

[0162] Los resultados del análisis de VLP se resumen en la Tabla III:

Tabla III

Caracterización de partículas virales purificadas de <i>Drosophila</i> xAPC					
Densidad (g/mL)	Candidato virus	Tamaño	Proteínas	Ácido nucleico	Análisis de secuencia de ADN
1.41	<i>como HPS-1</i>	42nm	~100 kD	dsRNA (6 kb)	28% homólogo a ARN polimerasa dependiente de
1.36	<i>Drosophila Nodaviridae</i>	30nm	43 kD	ssRNA (3.0 kb + 1.2 kb)	88% homólogo a FHV ¹ , BBV ² & BV ³

(continuado)

Caracterización de partículas virales purificadas de <i>Drosophila</i> xAPC					
Densidad (g/mL)	Candidato virus	Tamaño	Proteínas	Ácido nucleico	Análisis de secuencia de ADN
1.30 ⁴	<i>HPS-1 vacía como el virus X</i>	42nm 60nm	~100 kD	No ácido nucleico	N/A ND
¹ FHV=Flock House Virus (Insect <i>Nodavirus</i>) ² BB= Black Beetle Virus (Insect <i>Nodavirus</i>) ³ BV= Boolarra virus (Insect <i>Nodavirus</i>) ⁴ Dos tipos de partículas identificadas; partículas de 60nm representan 1: 100 de la preparación purificada ND = no determinado; N/A = no aplicable					

Densidad de partículas 1,41

[0163] Basándose en el análisis de proteínas y ácidos nucleicos, la densidad de partículas 1,41 no parecen pertenecer al género *Densoviridae*, que se caracteriza por dsDNA entre 4 y 6 kb y al menos tres proteínas estructurales en el intervalo de 40 a 90 kd. Fue realizada la secuenciación N-terminal del polipéptido de 100 kd y la secuencia de aminoácido utilizada para clonar la secuencia N-terminal homóloga del genoma viral. El análisis de secuencia mostró esta novedosa proteína, con 28% de homología con ARN polimerasa dependiente - ARN viral. El análisis de espectrofotometría de masas (MALDI-MS) confirmó la novedad de esta proteína también. Digestión trípica y secuenciación de Edman de péptidos purificados a partir de la proteína de 100 kd confirmaron los datos de ácidos nucleicos. Análisis basado en RNasa y DNasa del ácido nucleico viral purificado se confirmó que el genoma era de hecho dsRNA y no dsDNA, eliminando así densovirus como uno de los tres virus de insectos. Estas observaciones eran más consistentes con el virus HPS-1 de las células de *Drosophila* SC2 descrito por Scott et al (véase p.ej., Scott et al., Cell, Vol. 33 (3), pp. 929-941 (1980)). Este virus fue descrito con 36 nm de diámetro viriones no-envueltos presentes principalmente en el núcleo de las células infectadas. Partículas purificadas se encontraron a una densidad de 1,41 y contenían un único segmento de dsRNA de aproximadamente 6 kb de longitud, asociado a una proteína principal (120 kd) se cree que es la cubierta de la proteína viral, junto con una proteína menor (200 kd).

[0164] Fue desarrollado un ensayo RT/PCR cuantitativo tiempo real para detectar en las células la presencia de HPS-1-como virus. El procedimiento da como resultado la amplificación de una secuencia específica de virus de 241 bases de longitud. Experimentos de adición de plantilla viral específico como cDNA HPS-1 preparado a partir de células CD8 + confirmó la sensibilidad de detección de virus es de entre 10-100 copias por µg de DNA.

Densidad de partículas 1,36

[0165] Análisis de las proteínas y de ácidos nucleicos a partir de la densidad de partículas purificadas 1,36 confirmaron este virus es del género *Nodaviridae*. Se completó la secuencia de ADN que representa ARN1 (3,0 kb) y resultó ser aproximadamente 90% homóloga al virus Flock House, un virus de insecto de la familia *Nodaviridae*. También se completó clonación de larga duración y secuenciación del segmento ARN2 y la secuencia de aminoácidos N-terminal de la cubierta de proteína de 43 kd era homóloga tanto con el virus de *Drosophila Nodaviridae* (DrNV) aislada la cubierta de proteína y el virus Flock House, tal como se indica abajo:

DrNV DNA: MVNNIKPRRQRSQRV (SEQ ID NO.80)
 Proteína 43 kd: VNNIKPKRQRPQ-V (SEQ ID NO.81)
 DNA Virus Flock: MVNNIKPRRQRAQRV (SEQ ID NO.82)

[0166] Fue desarrollado un ensayo RT/PCR cuantitativo tiempo real para detectar en las células la presencia de virus *Drosophila Nodaviridae*. El procedimiento da como resultado la amplificación de una secuencia específica de virus de 133 bases de longitud. Experimentos de adición de plantilla viral específico de *Nodaviridae* en cDNA preparado a partir de células CD8+ confirmó la sensibilidad de detección de virus de entre 10-100 copias por µg de ADN.

Densidad de partículas 1,30

[0167] Extracción de ácido nucleico de partículas en densidad de 1,30 falló para producir ADN o ARN. El perfil de SDS/PAGE de esta preparación era idéntico al obtenido para la preparación a una densidad de 1,41. Junto con las observaciones de microscopía electrónica, estos resultados sugieren que esta preparación se compone principalmente de partículas virales vacías HPS-1, con algunas partículas de mayor tamaño (60 nm) en un número insuficiente para caracterizarse adicionalmente.

[0168] Una serie de virus del género *Reoviridae*, con características compatibles con este tercer virus (localización, formación de matrices cristalinas, y tamaño) ha sido reportada para infectar células de insectos, incluyendo *Drosophila* (véase, p. ej., Haars et al., *Virology*, Vol. 101(1), pp. 124-130 (1980)). Se generó un gran número de cebadores de PCR, basada en secuencias conservadas entre los reovirus de insectos, y utilizados para cDNA preparado a partir de las xCPA de *Drosophila*. No se amplificó secuencia Reovirus a partir de ADNc preparado a partir de estas células.

[0169] Virus X *Drosophila* (DXV) es un virus dsRNA de la familia *Birnaviridae* y conocido por infectar algunas líneas celulares de *Drosophila* (véase, p. ej., Shwed et al., *Virology*, Vol. 296 (2), pp. 241-250 (2002)). El virión de 60 nm tiene una densidad de flotación de 1,34, con cápsidas vacías que sedimenta a una densidad de 1,29. El genoma consta de dos segmentos, el segmento A (3360 pb) y el segmento B (3100 pb). Un set de cebadores de PCR específicos para DXV fue diseñado y utilizado para sondear la presencia de DXV en las xCPA de *Drosophila*. Se obtuvo una banda de PCR amplificado de peso molecular esperado y la fracción de secuencia amplificada (682 pb) era idéntica a la secuencia publicada DXV.

[0170] Además, algunas secuencias DXV fueron clonadas a partir de la fracción purificada de densidad 1,36, junto con una mayoría de secuencias de *Nodaviridae*. Estos resultados son consistentes con la literatura publicada, que describe partículas infecciosas en densidades de flotación en 1,33 a 1,34, con partículas vacías en 1,29. En consecuencia, las partículas de 60 nm observadas por TEM en la fracción de densidad de 1,30 no eran *Reoviridae* como cree basado en tamaño y forma, pero las partículas vacías DVX. Esto explica la incapacidad de extraer el ADN o ARN de estas VLP.

[0171] Fue desarrollado un ensayo RT/PCR cuantitativo tiempo real para detectar en las células la presencia de virus *Drosophila X*. El procedimiento da como resultado la amplificación de una secuencia específica de virus originado de la poliproteína del virus de 178 bases de longitud. Experimentos de adición de plantilla viral específico de DXV en cDNA preparado a partir de células CD8+ confirmó la sensibilidad de detección de virus es de entre 10-100 copias por mg de DNA

Ejemplo 2: Inactivación de las xCPAs *Fijación glutaraldehído*

[0172] La inactivación de células de *Drosophila* inicialmente se intentó por fijación con glutaraldehído en ausencia de conservante. Los xAPCs de *Drosophila* fijados con 0,3% de glutaraldehído eran capaces de proliferación de antígeno específico de las células T CD8+ (2,5 a 6 veces menos que las células no fijadas), la activación de las células T CD8+ (2 veces menos que las células no fijadas), y la generación de células T CD8+ capaces de lisar las células diana (en menor grado que las células no fijadas). Por lo tanto, este procedimiento de inactivación resultó en que las xCPAs de *Drosophila* habían disminuido la función de la CPA con respecto a las células no inactivadas por el protocolo de fijación con glutaraldehído.

Ciclo de congelación-descongelación

[0173] En un segundo intento para inactivar a las xCPAs de *Drosophila* sin disminuir la función xCPA, se realizaron una serie de ciclos de congelación-descongelación. Los ciclos de congelación conllevaron a la colocación de las xCPAs, ya sea en nitrógeno líquido o hielo seco (CO₂ sólido) hasta que las xCPAs estuvieran completamente congeladas (p. ej., durante aproximadamente un minuto), y luego eliminando las xCPAs de la forma de nitrógeno líquido o hielo seco y permitiendo que las xCPAs regresen a temperatura ambiente. Los ciclos de congelación-descongelación se realizaron con las xCPAs en medios que carecía de conservante, dimetilsulfóxido conservante (DMSO). Este método dio como resultado 100% células no viables (es decir, muertas) después de dos ciclos de congelación-descongelación tal como según la evaluación por tinción con azul de tripano. Estas células no viables fueron capaces de estimular las células T CD8+, generando los CTL con actividad citolítica de antígeno-específico comparable a la actividad citolítica

observada con las células T CD8+ que fueron estimuladas con las xCPAs de *Drosophila* que no fueron sometidas a un ciclo de congelación-descongelación. Además, los estudios de congelación-descongelación demostraron que las xCPAs de *Drosophila* puede ser inducidas, carga de péptido, y congelación-descongelación, y luego posteriormente utilizadas para estimular a las células T naive; por lo tanto, no será necesario disponer de forma continua de las xCPAs de *Drosophila* en el cultivo con el fin de preservar la función xAPC.

Tratamiento Psoraleno/UVA

[0174] El método de congelación-descongelación demostró que las xCPAs de *Drosophila* se volvieron sustancialmente no-viables reteniendo la capacidad de activar las células T naive. Sin embargo, permaneció una preocupación y esta es que el ácido nucleico asociado con las xCPAs xenogénicas pueden retener alguna actividad o algún grado de contaminación bacteriana o viral después del ciclo de congelación-descongelación. Deseando inactivar el ácido nucleico xenogénico asociado con las xCPAs para producir un sistema de presentación de antígenos altamente funcional esencialmente libre de ADN, ARN, bacteriano o contaminantes virales, fue probado un régimen de inactivación que implica la exposición de las xCPAs a un miembro de la familia de moléculas de psoraleno seguido de exposición a la radiación ultravioleta de onda larga (UVA). Se realizaron diversos estudios con varios miembros de la familia de psoraleno, que incluyen: psoraleno (7-H-furo [3,2-g] benzopiran-7- uno, disponible en Sigma) y un grado clínico de psoraleno derivado de 9-metoxi-7H-furo[3,2-g]-1-benzopiran-7-uno (también conocido como methoxsalen, 8-metoxipsoraleno (8-MOP) y comercializado bajo el nombre de marca comercial UVADEX™).

[0175] Se usó un ensayo de infectividad de un baculovirus/Sf9 para determinar si el tratamiento derivado de psoraleno/UVA fue suficiente para inactivar virus asociados a células de insecto infectadas por el virus. Se infectaron células de insecto Sf9 con BacPAK6 de stock viral y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora (kit rápido título BacPAK6 baculovirus; BD Biosciences Clontech). Las células infectadas se dejaron sin tratar o se trataron con (5mg/ml) UVADEX™ y se irradiaron con radiación ultravioleta de onda larga (320 nm - 380 nm, UVA) a partir de una fuente de luz por encima del recipiente y una fuente de luz debajo del recipiente durante aproximadamente 5 minutos (10-15 mW/cm²). Cinco días después de la irradiación, se recogieron los sobrenadantes del cultivo. De estos, se prepararon nuevos stocks de virus via de diluciones seriadas de 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵, respectivamente. Estas diluciones en serie de stock diluidas cada uno fue utilizado para infectar un segundo conjunto fresco de cultivos de células Sf9 (es decir, no infectadas previamente). Este segundo grupo de cultivos se cubrió con metilcelulosa y se cultivó durante aproximadamente 48 horas. Los sobrenadantes del cultivo de este segundo set fueron desechados y se añadió un anticuerpo de proteína monoclonal de ratón anti-gp64 (específico de baculovirus) (Invitrogen). Después de un período inubación y varios lavados para eliminar el anticuerpo anti-gp64 no unido, (es decir, anticuerpo secundario obtenido de Invitrogen) se añadió un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante. El anticuerpo secundario no unido se eliminó con varios lavados, y se añadió peroxidasa. Se contó el número de focos teñidos y el título de virus (pfu/ml) se calculó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0176] Como se muestra en la Tabla IV a continuación, cinco minutos de UVA (350-400nm) período de tiempo de irradiación fue suficiente para evitar la replicación de baculovirus en los cultivos de indicador de células Sf9, mientras que el control, las células no tratadas contenían un título viral de 8×10^8 unidades formadoras de placa (PFU)/ml de baculovirus.

Tabla IV: UVADEX™ /UVA tratamiento de inhibición de replicación del virus en las células Sf9 infectadas de baculovirus

Tiempo de irradiación UVA	Virus añadido	Título de virus (10 ⁻⁴)			Título de virus (10 ⁻⁵)		
0 minutos	-	0	0	0	0	0	0
0 minutos	+	>500	>500	>500	232	210	198
5 minutos	+	0	0	0	0	0	0
10 minutos	+	0	0	0	0	0	0

[0177] En un experimento similar, las células Sf9 fueron infectadas con las dosis tituladas de baculovirus como se describió anteriormente. Las células infectadas fueron tratadas con 5µg/ml of UVADEX™ a 4 °C durante 30 min seguido por irradiación UVA durante 0 minutos, 2 minutos, 10 minutos o 20 minutos, respectivamente. Las células tratadas fueron cultivadas a 28 °C durante cuatro días. Se recogió sobrenadante del cultivo y se utilizó para infectar nuevos cultivos de células Sf9 sembradas en placas de 96 pocillos. Se detectaron Baculovirus en células Sf9 mediante un ensayo rápido de microtitulación (Invitrogen). Las placas de cultivo se cubrieron con metilcelulosa y se cultivaron durante 48 horas. El baculovirus se detectó por inmunoensayo con un anticuerpo de gp64 específico

(Invitrogen). Se contó el número de focis en cada pocillo y se calculó el título de virus (pfu/ml) del sobrenadante de las células infectadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados, presentados en la Figura 1, demuestran que el tratamiento UVADEX™ seguido de una exposición de dos minutos de UVA disminuyó el título de baculovirus del sobrenadante de cultivo recogido a menos del 10% del título de baculovirus visto en las células no tratadas/expuestas. El tratamiento UVADEX seguido por los tiempos de exposición de diez y veinte minutos UVA, respectivamente, no dio lugar a ningún título de baculovirus detectable.

[0178] Con el fin de determinar si el tratamiento con psoraleno/UVA podría inhibir la proliferación de las xCPAs, de las xCPAs clon B de *Drosophila* se dejaron sin tratar o se trataron con 5µg/ml UVADEX™ a 4 °C durante 30 minutos seguido de tratamiento UVA por 0, 2, 10, o 20 minutos. Las xCPAs tratadas se lavaron completamente para eliminar UVADEX residual y entonces ambas xCPAs tratadas y no tratadas se sembraron en placas de 6 pocillos a 1×10^6 células/ml y cultivadas de forma continua durante 16 días. Las xCPAs viables (es decir, en vivo) se contaron en el día 1, día 5, día 9, día 14, y el día 16 post-tratamiento mediante tinción con azul de tripano en cada cultivo.

[0179] Como se muestra en la Figura 2, la proliferación de xCPA de *Drosophila* se inhibió de manera efectiva por cada tiempo de duración de la exposición UVA probada, con una inhibición de aproximadamente 50% de la viabilidad de todos los cultivos tratados con UVA/UVADEX en aproximadamente nueve días después del tratamiento UVADEX/UVA. Por otra parte, al rededor de dos semanas después del tratamiento UVADEX/UVA casi no se detectaron células viables en cualquier cultivo tratado. Por el contrario, las xCPAs no tratadas con UVADEX/UVA muestran viabilidad robusta, casi triplicando el recuento de células dentro de los catorce días en cultivo. Por lo tanto, se concluyó que el tratamiento UVADEX/UVA atenúa eficazmente la proliferación de xCPA, incluso en la duración de tiempo probada más baja UVA (2 minutos).

[0180] Fue posible que el ácido nucleico xenogénico introducido en las xCPAs podría haber permanecido activo, a pesar de que las mismas xCPAs se habían vuelto no proliferativas. Con el fin de determinar si el tratamiento con psoraleno/UVA inactiva el ácido nucleico xenogénico introducido en las xCPAs, se realizó un análisis de transcripción del ácido nucleico xenogénico de las xCPAs clon B de *Drosophila* después de que cualquier γ -irradiación o tratamiento UVADEX/UVA. Las xCPAs clon B de *Drosophila* se dejaron sin tratar, se trató con UVADEX™ (5 µg/ml)/UVA, o fueron tratados con γ -radiación por 50 min (entrega de aproximadamente 16,000 rads). Cada cultivo de las xCPAs se lavó y se co-cultivó durante 10 semanas con un indicador de línea celular de *Drosophila* designado aquí como clon D, que es una línea celular que no ha sido modificada por la introducción de ácido nucleico xenogénico. La transcriptasa inversa (RT)-PCR utilizó cebadores específicos de reacciones para HLA A2.1, B7-1, B7-2, and β transcripciones 2m después fueron realizadas en los extractos de los co-cultivos. Los resultados, representados en la figura 3, se muestra que tanto las no tratadas y las xCPAs tratadas con γ -radiation contenían ácido nucleico xenogénico activo, como se evidencia por la detección de HLA A2.1, B7-1, B7-2 xenogénico y transcripciones β 2m (carriles 2 y tres, respectivamente). Por el contrario, ninguna de las xCPAs tratadas con UVADEX™ (5mg/ml) y UVA, independientemente de la duración del tratamiento, contenía ácido nucleico xenogénico activo, como se evidencia por la ausencia de niveles detectables de HLA A2.1, B7-1, B7-2 xenogénico y transcripciones β 2m. Por lo tanto, se concluyó que el tratamiento UVADEX (5mg/ml)/UVA de las xCPAs inactiva el ácido nucleico xenogénico que se introdujo en las xCPAs.

[0181] Como ciertos virus citolíticos adventicios, micoplasmas y otros organismos microbianos pueden estar asociados con las xCPAs además del ácido nucleico xenogénico introducido en las xCPAs, era deseable determinar si el régimen de tratamiento UVADEX/UVA inactivava estos contaminantes esenciales de las xCPAs. De este modo, se recogió un cultivo xCPA que contenía aproximadamente 6×10^8 xCPAs de *Drosophila* (clon B), suspendido en 0,6 ml de medio de Schneider en hielo, y se sonicó durante 30 segundos. Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación, y el sobrenadante se recolectó y se estratificó sobre un cojín de cloruro de cesio (CsCl), a una densidad de 1,2 (20% w/w CsCl), en una proporción de tres volúmenes de sobrenadante a un volumen de CsCl. A continuación, el cojín de CsCl de sobrenadante cargado se ultracentrifugó a 25.000 rpm durante cuatro horas. Fracciones virales fueron recolectadas y se midieron las densidades de fracciones. Tres fracciones de un mililitro a una densidad de 1,0 a 1,2 fueron agrupadas y se dializaron frente frente al tampón fosfato salino (PBS), generando un stock viral, y se almaceno el stock viral a - 80 °C hasta su uso. Una parte alícuota del stock de virus, equivalente a lisado de aproximadamente 1×10^8 xAPCs, se sometió a tratamiento UVADEX™/UVA (5 mg/ml por 10 minutos) o no fue tratada. Cultivos independientes (1×10^6 células/cultivo) indicador de la línea celular clon D de *Drosophila* se incubaron a 28 °C, con cualquiera de las alícuotas virales tratadas y no tratadas. Después de un período de incubación de tres días, se recogieron los cultivos d indicador de células y se tiñeron con yoduro de propidio (PI) ($1 \text{ mg/l} \times 10^6$ células) a 4 °C durante 10 minutos. Las células vivas y líticas se analizaron mediante FACS, con los resultados representados en las Figuras 4A-4C.

[0182] El stock de virus sin tratar alícuota aislada de las xCPAs infectadas en el indicador de la línea celular, equivalente a aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de placa (pfu), dio lugar a la lisis de esencialmente todas las células en indicador de línea celular del cultivo como se observa por microscopía de muestras de cultivo (imagen del campo microscópico representativo, Figura 4A). Por el contrario, la parte alícuota de stock de virus aislado de los xAPCs que fue sometido a UVADEX™/UVA (5 mg/ml durante 10 minutos) no resultó en cualquier

infección observable en el indicador de células o de lisis (imagen del campo microscópico representativo, figura 4B).

[0183] En un experimento similar, un set de diluciones seriadas del stock viral de xCPA que consistía de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , y 10^{-9} diluciones las cuales se dejaron sin tratar o se trataron con UVADEX/UVA (5 mg/ml durante 10 minutos) antes de ser incubados con cultivos de células de *Drosophila* indicador clon D. Después de un período de incubación de tres días, el porcentaje de células viables se cuantificó en cada indicador de la línea celular del cultivo. Los resultados, se reflejan en la figura 4C, muestran que la fracción viral tratada fue casi completamente incapaz de infectar y lisar el indicador de la línea celular del cultivo en absoluto, sino la dilución probada más baja. Sin embargo, la fracción viral no tratado era capaz de efectuar la lisis del 80% aproximadamente del indicador de la línea celular del cultivo en el 10^{-5} dilución fracción viral.

[0184] Con el fin de confirmar que el ácido nucleico xenogénico asociado con las xCPAs tratadas con UVADEXTM/UVA no fue transitoriamente infecciosa, y no se expresó transitoriamente hacia y en el indicador de células clon D, fue realizado el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) en las xCPAs de *Drosophila* co-cultivos de clonB/clon D. A modo de comparación, γ -radiation- co-cultivos de xCPA clon B/clon D tratados y co-cultivos de xCPA clon B/clon D no tratados fueron analizados mediante FACS de la misma manera.

[0185] Cultivos xCPAs (clon B) de *Drosophila* se dejaron sin tratar, se trataron con UVADEX/UVA (5 mg/ml), o γ -radiación-tratados durante 50 minutos (entrega de aproximadamente 16.000 rads). Las células de cada cultivo fueron lavadas y luego co-cultivadas con indicador de células clon D durante 10 semanas. Se recogieron las células co-cultivadas y alícuotas, y cada parte alícuota se tiñó con una de HLA-A2, B7-1 e ICAM-1 isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado con anticuerpos monoclonales (mAbs), respectivamente. Los co-cultivos teñidos después fueron analizados por FACS. Como se muestra en la figura 5, los co-cultivos que contienen xCPAs sin tratar expresan HLA-A2, B7-1, e ICAM-1; los cocultivos que contienen xCPAs γ -radiación tratadas muestran modesta, pero expresión significativa de HLA-A2, B7-1, e ICAM-1; y los co-cultivos que contienen xCPAs tratados con UVADEXTM/UVA muestran niveles indetectables de HLA-A2, B7-1, e ICAM-1.

[0186] En un experimento similar, se indujeron cultivos de xCPA de *Drosophila* para expresar moléculas exógenas codificadas por vectores recombinantes, y después se incubaron con UVADEXTM (5 mg/ml) y se trataron con UVA durante 0, 5 o 15 minutos. Los cultivos de xCPA se lavaron y se tiñeron con anticuerpos monoclonales específicos para HLA-A2, B7-1, o ICAM-1 y analizados por FACS. Como se muestra en la figura 6, el nivel de expresión en la superficie de cada una de las tres moléculas exógenas fue esencialmente la misma para todas las duraciones de tiempo UVA probadas.

[0187] En conjunto, estos resultados demostraron que las xCPAs de *Drosophila* que son inactivados por tratamiento psoraleno/UVA se habían vuelto esencialmente no viables y, esencialmente, no infecciosas. Además, las xCPAs inducen a expresar el ácido nucleico exógeno de tal manera que las proteínas codificadas se expresaron en la superficie celular de la xAPC antes de la inactivación mediada por psoraleno/UVA, retienen la pre-inactivación de los niveles de expresión de las proteínas exógenas posteriores a la inactivación.

Expansión del péptido seleccionado específico y activación de células T naive tras la incubación con xCPAs inactivada de Drosophila

[0188] Fueron purificadas las células T CD8+ naive de los leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes de HLA-A2-positivo y cultivadas a 37 °C con xCPAs tratadas con UVADEXTM/UVA tratadas o con xCPAs tratadas con UVADEXTM/UVA más congelación-descongelación en presencia de 10 μ g/ml de un péptido MART-1 correspondiente a los aminoácidos 27-35 de MART-1 humana (AAGIGILTV; SEQ ID NO. 9). Cada día se añadió recombinante humana (r) IL-2 (20 unidades/ml) y rIL-7 (30 unidades/ml) después del quinto día del periodo de cultivo. Las células T CD8+ se volvieron a estimular dos veces en los días séptimo y quince del periodo de cultivo con células adherentes no-CD8 en PBMC del mismo donante en presencia de los péptidos MART-1. Las células T CD8+ expandidas fueron contadas después del día 21 del cultivo mediante tinción con azul de tripano. Los resultados, se resumen en la Tabla V a continuación, muestra que cuando las xCPAs están sin tratar, UVADEXTM/UVA-tratada o UVADEXTM/UVA más congelación-descongelación-tratada, las células T CD8+ estimuladas proliferan (es decir, se expanden) a tasas similares.

Tabla V: Número de células T CD8+ después del cultivo con péptido-cargado de los xAPC

Experimento (día 21)	No tratamiento (CD8 ⁺ x 10 ⁶)	UVADEX/UVA (CD8 ⁺ x 10 ⁶)	UVADEX/UVA + Congelado (CD8 ⁺ x 10 ⁶)
Donante 1	38.20	42.60	52.90
Donante 2	11.96	9.94	13.44
Donante 3	26.04	24.24	35.04
Donante 4	16.74	15.66	17.80

[0189] Fueron purificadas las células T CD8⁺ naive de (PBMC) de donantes de HLA-A2-positivo y cultivadas con xCPAs tratadas con UVADEX™/ UVA tratados o con xCPAs tratadas con UVADEX™/ UVA más congelación-descongelación a 37 °C en presencia 10 mg/ml del péptido de MART- 1 (secuencia de aminoácido AAGIGILTV (SEQ ID NO:9)). Se añadió recombinante humana (r) IL-2 (20 unidades/ml) y rIL-7 (30 unidades/ml) después del quinto día del periodo de cultivo. Las células T CD8⁺ se volvieron a estimular dos veces en los días séptimo y quince del periodo de cultivo con células adherentes no-CD8 en PBMC del mismo donante en presencia de los péptidos MART-1. Las células T CD8⁺ + expandidas fueron teñidas con MART-1 tetrameros (Beckman Coulter) que consta de cuatro moléculas de MHC unidos al péptido MART-1, que se conjuga a una proteína fluorescente, y fueron analizados por FACS. El resumen de los resultados en la Tabla V más adelante, muestran que la incubación de células T CD8⁺ tratadas previamente con xCPAs resultó en un mayor porcentaje de péptido/tetramero de MHC (pMHC) positivos derivado de todos los donantes puestos a prueba. Además, la incubación de las células T CD8⁺ naive con UVADEX/UVA más xCPAs tratadas con congelación-descongelación resultó en un mayor porcentaje de tetramero pMHC positivo de los CTLs que las xCPAs tratadas UVADEX/UVA solo en tres de los cuatro donantes (donantes 1, 2 y 3).

Tabla VI.

Porcentaje p/CMH tetrameros de células T CD8 ⁺ después del cultivo con péptido-cargado de los xAPC			
Experimento	No tratamiento (%Tetr + CD8 ⁺)	UVADEX™ (%Tetr + CD8 ⁺)	UVADEX™/Congelado (%Tetr + CD8 ⁺)
Donante 1	0.81	0.95	1.52
Donante 2	9.94	11.55	14.50
Donante 3	8.71	15.07	21.35
Donante 4	20.06	43.33	21.88

[0190] Para investigar la medida en la que las xCPAs inactivadas, cuando se cargan con el péptido seleccionado, células T naive activas para convertirse en los CTL, células T CD8⁺ naive fueron purificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes positivos de HLA-A2 y cultivadas a 37 °C con xCPAs no tratadas de *Drosophila* xCPAs UVADEX/UVA tratadas de *Drosophila* o xCPAs de *Drosophila* UVADEX/UVA más congelación-descongelación tratadas en presencia de 10 µg/ml de péptido MART-1 correspondiente a los aminoácidos 27-35 de la proteína de MART-1 humana, AAGIGILTV (SEQ ID NO. 9). Se añadieron interleucina humana recombinante (rIL) -2 (20 unidades / ml) y rIL-7 (30 unidades / ml) a cada uno de los cultivos en el quinto día del período de cultivo. Las células T CD8⁺ se volvieron a estimular dos veces al día en los días séptimo y quince del periodo de cultivo con las células no adherentes CD8 de PBMC del mismo donante en la presencia del péptido MART-1 (SEQ ID NO.9). Se recogieron las células T CD8⁺ cultivadas en el día 21 del período de cultivo, y la actividad de CTL se midió por ensayo de liberación de 51Cr estándar, que proporciona una medida directa de la muerte celular específica (es decir, la actividad citolítica).

[0191] Los resultados, representados en la figura 7, muestran que los CTL de tres de los cuatro donantes (donantes 1, 3, y 4) mostraron una mayor % de destrucción específica cuando es activado por cualquiera de xCPAs UVADEX/UVA tratadas o con xCPAs UVADEX/UVA tratadas más congelación-descongelación en relación con los CTL activados por xCPAs no tratadas. Los CTL del donante 2 mostró menor % de destrucción específica cuando fue activado por xCPAs UVADEX/UVA tratadas, pero mayor % de destrucción específica cuando fue activado mediante con xCPAs UVADEX/UVA tratadas más congelación-descongelación, en relación con las xCPAs no tratadas. Además, en tres de los cuatro donantes (donantes 1, 2, y 3) los CTL activados por xCPAs UVADEX/UVA tratadas más congelación-descongelación mostraron mayor % de destrucción específica%, además de los CTL activados solo por UVADEX / UVA .

[0192] En conjunto, estos experimentos demostraron que las xCPAs sometidas ya sea a psoraleno/UVA o a un régimen de psoraleno/UVA más congelación-descongelación se volvieron esencialmente no viables y no infecciosas, y poseían esencialmente equivalente o mejorada expresión de la proteína exógena, carga de péptidos

seleccionado y presentación, y las propiedades de activación de células T CD8+ naive relativos a aquellas poseídas por las xCPAs que no fueron sometidas a estos regímenes de inactivación.

5 **[0193]** Con el fin de investigar la base molecular para la función mejorada de la CPA observada con xCPAs tratadas con psoraleno/LTVA, xCPAs de *Drosophila* expresando Kb, B7-1, y moléculas ICAM-1 fueron cargadas con un péptido OVA8 (SIINFEKL; SEQ ID NO.69) y luego se trató con o sin UVADEX/UVA. Las células T naive CD8+ se purificaron a partir de ratones C57BL/6 (B6) o ratones knockout MyD88 (MyD88^{-/-}) y se cultivaron con xCPAs de *Drosophila* UVADEX/UVA tratados o no tratados que se habían cargado con el péptido OVA8. Se añadió IL-2 en el día tres y cinco del co-cultivo de células T naive CD8+ de xCPA El co-cultivo fue dividido en siete días del periodo de co-cultivo, y en el día nueve se recogieron las células T CD8 + cultivadas. Una preparación de tetrámero OVA8/MHC (Beckman Coulter) fue realizada, 10 µl se mezclaron con 1 x 10⁶ células T CD8+ células/100 µl de tampón FACS (0.5% BSA, 0.2% NaN₃ in PBS). Los tetrámeros Kb/OVA8 consistieron en cuatro moléculas de MHC unido al péptido OVA8, que se conjuga con una proteína fluorescente. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lavó en PBS, y luego se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos. El sedimento celular se re-suspendió en tampón de FACS (500 µl) y se leyó inmediatamente en el FACScan de máquina de citometría de flujo a una longitud de onda de excitación de 486 nm - 580 nm y una longitud de onda de emisión de 586 nm - 590 nm. Los resultados mostraron que un mayor porcentaje de células T CD8+ aisladas de ratones de tipo salvaje (C57BL/6 (B6) estos se tiñeron con el tetrámero Kb/OVA cuando se activan con xCPAs de *Drosophila* UVADEX/UVA tratadas en comparación con el porcentaje de células T CD8+ teñidas cuando se activan por células XCPAs no tratadas de *Drosophila* (Figura 8A, carril 2 vs. carril 1). Sin embargo, no se observó aumento en el porcentaje de células T CD8+ aisladas de ratones MyD88 knockout (MyD88^{-/-}) estos se tiñeron con el tetrámero Kb/OVA cuando se activan con xCPAs de *Drosophila* UVADEX/UVA tratadas en comparación con el porcentaje de células T CD8+ teñidas cuando se activan por células XCPAs no tratadas de *Drosophila* (Figura 8B, carril 4 vs. carril 3). Por lo tanto, se concluyó que la activación mejorada observada se produce dependiendo de la presencia de la proteína MyD88 cuando las células T fueron incubadas con xCPAs de *Drosophila* UVADEX/UVA tratadas.

Ejemplo 3: Preparación de antígeno humano de melanoma dirigido a linfocitos T citotóxicos para terapia celular

30 **[0194]** Los ejemplos anteriores describen la caracterización, la inactivación, y el uso posterior de las xCPAs cargadas con péptido seleccionado en los métodos para activar las células T naive autólogas *ex vivo*. Las células T activadas resultantes son citotóxicas 35 hacia las células diana de una manera específica de antígeno seleccionado. Este ejemplo describe la preparación de un producto de terapia preferido de CTL diseñado para su uso en un régimen de terapia celular para el tratamiento de pacientes con cáncer de melanoma en un entorno clínico. Las figuras 9A-9F proporcionan un diagrama de flujo delineando los pasos del proceso, incluyendo los procedimientos de caracterización de xCPA y CTL así como los procedimientos de control de calidad del producto.

Cultivo, inducción y carga de péptido de los xCPAs de *Drosophila*

40 **[0195]** Las células de *Drosophila* se cultivan en un cultivo continuo a 27 °C en medio de *Drosophila* de Schneider suplementado con suero bovino fetal al 10% y G418 (Geneticina). El cultivo continuo de células de *Drosophila* se divide dos veces a la semana y se añade medio fresco para ajustar la densidad celular de 1 x 10⁶/mL. En el Día -3 o -2, células de *Drosophila* se dividen en 1 x 10⁶ /mL y se cultivan en un medio sin G418. En el Día -2 o -1, se inducen las células de *Drosophila* para convertirse en xCPAs mediante la adición de CuSO₄ a 1 mM y se prueban en el día 0 para verificar la expresión de HLA-A2, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD54 (ICAM-1) y CD58 (LFA-3) por análisis FACS antes de la carga de péptidos. Preferiblemente, □□80% de los xCPAs expresan moléculas co-estimuladoras CD54 (ICAM1), CD58 (LFA3), CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) y HLA-A2.1 (Clase I) en un momento dado. El uso de células se interrumpe cuando la expresión de HLA-A2.1 o las otras moléculas humanas declina a □30%.

50 **[0196]** Las xCPAs de *Drosophila* y los virus asociados se inactivan con un régimen de psoraleno/UVA como se ha descrito anteriormente. La Inactivación y esterilidad de la xCPAs pueden evaluarse mediante la realización de cualquiera o todos los procedimientos de caracterización xCPA como se describió anteriormente. En el Día 0, el inducido, xCPAs de *Drosophila* inactivada (1 x10⁷/mL) se carga con los siguientes péptidos asociados al melanoma, a 0,1 mg/ml por péptido: YMNGTMSQV (SEQ ID NO.5); YMDGTMSQV (SEQ ID NO.6); AAGIGILTV (SEQ ID NO.9); ITDQVPFSV (SEQ ID NO.7); KTWGQYWQV (SEQ ID NO.70); and YLEPG-PVTA (SEQ ID NO.8). 55 La carga de péptidos se realiza durante un mínimo de 4 horas a temperatura ambiente en medio de insecto HYQ SFX suplementado con 5 mg/ml de beta-2 microglobulina. Las células de *Drosophila* cargadas con péptido se mezclan entonces con las células CD8+ purificadas como se describe a continuación.

Recolección y procesamiento de la muestra de aféresis

5 **[0197]** El producto de aféresis linfática, que contiene leucocitos obtenidos del sujeto, se obtiene de un paciente en un centro clínico. Tras la recogida, los productos de aféresis linfática y extracción de sangre (una bolsa permeable a los gases de las células re-suspendida en plasma autólogo y cinco tubos de tapa roja de 10 ml de sangre, respectivamente) se envían el mismo día a temperatura ambiente en contenedores de transporte de sangre estándar que contienen un conjunto de datos de registro de temperatura. A los envíos se les da un seguimiento y se reciben al día siguiente. El producto de aféresis linfática se mantiene a temperatura ambiente hasta 48 horas después de la recogida.

15 **[0198]** Con el fin de generar una preparación de suero inactivado por calor de los tubos de tapa roja de la sangre, los tubos se limpian con alcohol y se transfieren a una cabina de bioseguridad. Con una pipeta de 5 ml, la fracción líquida se transfiere a tubos cónicos de 15 ml y se centrifuga durante 10 minutos a 3.000 rpm (1800 x g). El sobrenadante (suero) se transfiere entonces a un tubo cónico de 50 ml, los sedimentos de células rojas de la sangre se desechan, y el sobrenadante es inactivado por calor incubándolo durante 30 minutos en un baño de agua a 56 °C. El suero inactivado por calor se divide a continuación en alícuotas en tubos cónicos de 15 ml y se almacena a 4 °C. Este suero inactivado por calor se usa para iniciar el cultivo de células CD8.

20 **[0199]** Con el fin de generar una preparación de suero inactivado por calor a partir de plasma recogido de producto de aféresis linfática, se determina una cantidad suficiente de CaCl₂ para neutralizar el citrato de sodio presente en la porción de plasma del producto de aféresis linfática. Esta determinación se realiza mediante la supresión de seis 1 ml de alícuotas de plasma a partir del producto aféresis linfática en seis tubos de poliestireno. Se añaden diez, 15, 20, 25, 30, or 35 ml de CaCl₂ 1 M estéril de forma independiente para cada uno de los seis tubos, de modo que cada tubo contenga diez, 15, 20, 25, 30, o 35 ml de CaCl₂. Los tubos y el plasma restante, que se coloca en una botella de Nalgene 500 ml, se colocan en un baño de agua a 37 °C y se incuban durante 30 minutos. Si el coágulo es suave después de la incubación a 37 °C, la incubación se extiende otros 15 minutos a temperatura ambiente para conseguir la coagulación completa. La cantidad más baja de CaCl₂ necesaria para producir la coagulación completa se usa para determinar la concentración más baja de CaCl₂ necesaria para producir la coagulación completa en el plasma que queda en la botella Nalgene. Una cantidad de CaCl₂ suficiente para lograr esta concentración cuando se añade al volumen de plasma en la botella Nalgene entonces se añade a la botella de Nalgene. El tubo de la bolsa de transferencia 600 ml se sujeta a continuación con un tornillo de sujeción. El plasma se transfiere a la bolsa de transferencia de 600 ml perforando la bolsa con un equipo de transferencia de plasma (Carta Médica) y conectada a una jeringa de 60 ml con punta de deslizamiento. A continuación el tubo unido a la jeringa se sujeta, después de que el plasma ha sido transferido a la bolsa.

35 **[0200]** Se incuba el plasma reconstituido a 37 °C durante 30 minutos en el baño de agua, dejando el tubo de la bolsa fuera del baño de agua, y después se deja reposar a temperatura ambiente hasta que el coágulo comienza a encogerse. El suero de la bolsa del plasma coagulado se drena a continuación, en dos botellas de 250 ml (Nalgene; catálogo 2019-250), utilizando tubos conectados a la bolsa.

40 **[0201]** Antes de la inactivación térmica, dos muestras de 1,5 ml de este suero se alícuota, se coloca en tubos de Wheaton, y se almacenan a - 80 °C. El suero que queda en los dos 250 ml botellas Nalgene es entonces inactivado por calor mediante la incubación en un baño de agua a 56 °C durante 40 minutos. Después de la inactivación térmica, el suero se distribuye en tubos de 50 ml de centrifuga estériles y se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm (1,800 x g) para sedimentar el material insoluble. El material insoluble restante se elimina de los sobrenadantes mediante el filtrado de ellos, en filtros de 0.45 mm Los filtrados se distribuyen en 125 ml botellas estériles (Nalgene; catálogo No. 2019-125) y se almacenan a - 80 °C. Los tubos que contienen los gránulos insolubles se desechan.

50 *Selección poositiva de células CD8⁺ e isolación de las células non-CD8*

55 **[0202]** En el día 0, la CD8 + y las células no-CD8 se aíslan utilizando el Sistema de Selección Celular Magnética Isolex 300i. con un set desechable de tubos, anticuerpo monoclonal anti-CD8, perlas inmunomagnéticas (Dynabeads®) y una elución péptido CD8, AAEGLDTQRFSG (SEQ ID NO.83). El procedimiento de selección de células CD8+ es automatizado y consta de los siguientes pasos: la concentración de células y de plaquetas se lavan; incubación con anticuerpo anti-CD8; una etapa de formación de rosetas utilizando Dyna Beads® conjugado con oveja anti-ratón (SAM) de IgG; captura de células CD8+; y la eliminación de células no-CD8+.

60 **[0203]** Con el fin de llevar a cabo la concentración de células y plaquetas, se obtiene en la etapa de lavado del procedimiento de selección positiva de células CD8+, una bolsa de transferencia de dos litros (Fenwal; número de catálogo 4R2041), en la que aproximadamente 1,740 ml de tampón DPBS/ HSA/ citrato de lavado se transfiere por la perforación de la bolsa con un equipo de transferencia de plasma (Carta médica) y se conecta a un 60 ml con una jeringa con punta de deslizamiento. Después de la transferencia se sella el tubo.

65

Instalación de Isolex

5 **[0204]** La configuración y el procedimiento de prueba del sistema de selección celular magnética Isolex 300i se lleva a cabo hasta una hora antes de que se espera la llegada de las células del sujeto. El interruptor principal del Isolex 300i está encendido, y los controles internos automáticos están verificados, se han producido antes de que aparezca la pantalla de Nexell identificación de la versión del software. Después de que aparezca la pantalla "System Stop Verification", se presiona el botón "Stop" y luego se registran de la pantalla las escalas de peso y valores de la presión "Estado del dispositivo". Para llevar a cabo la inicialización del sistema, se siguen las instrucciones que aparecen en pantalla para limpiar los componentes del dispositivo. Una vez realizadas las pruebas de inicialización, se registran las escalas de peso y valores de la presión de la pantalla "Device Status" en el procesamiento de células y control de calidad ("After Initialization"). En la pantalla "Select a Procedure", se selecciona "Positive Selection Only".

Instalación del equipo desechable Isolex.

15 **[0205]** La bandeja que contiene el set desechable se retira de embalaje. El set desechable Isolex 300i se instala abriendo la puerta de la bomba y colgando las dos bolsas conectadas 2000 ml de residuos (bolsas B y C, respectivamente) en el soporte en el lado derecho del instrumento. El tubo se monta sobre la carcasa giratoria debajo de la pantalla. La única bolsa de 2000 ml (Bolsa A) se coloca en la parte superior del banco. La cinta de papel se retira del tubo de cámara y la cámara se instala en el módulo de eje de balancín. Ambas bolsas de lavado de recirculación (no.5) se cuelgan en escala de peso 5 con la bolsa filtrada de lavado colocada enfrente. La bolsa de producto final (N ° 4) se cuelga en escala de peso 4. La bolsa de anticuerpo (N ° 3) se cuelga en escala de peso 3. Por último, la bolsa de agente de liberación (No. 2) se cuelga en escala de peso 2. Todas las piezas restantes del set desechable en la bandeja se aflojan, y se retira la bandeja. A continuación, el conjunto de membrana de hilado es instalado en el módulo giratorio, asegurando que el brazo de soporte esté en su lugar y el dispositivo de giro esté colocado correctamente. La colocación adecuada de los tubos detrás de cada colector fue verificado, los dos colectores de sujeción superiores e inferiores, los tres colectores de sujeción están bloqueados en su lugar, y el organizador de la bomba encaja en su lugar. Después todos los tubos en el organizador se verificó que estén centrados en los rodillos de la bomba o en la superficie ranurada de la cubierta del módulo de bomba. Entonces se cierra la puerta de la bomba. El tubo P1 y el dispositivo giratorio de los tubos es verificado de no estar apretados por la puerta, y la bolsa de separación de imán secundaria está instalada en el imán secundario utilizando las guías de tubería. Entonces se cierra la puerta magnética.

35 **[0206]** Coincidencia de los puntos azules, tubos detectores de fluidos 1 y 2 están instalados, y la colocación de los tubos se confirma en la pantalla de "Device Status". Los accesorios de montaje están bien conectados a los transductores de presión 1 y 2. Cuando coincidan el punto azul, entonces se instala la tubería en el detector 3 de fluido.

40 Después se instala el tubo de cámara en la guía de tubo basculante en la parte inferior del brazo basculante. La cinta de papel que sostiene la bolsa tampón y báscula 5 del tubo de la bolsa se retira, y la bolsa fuente de células y el tubo del tampón de la bolsa está cubiertos de tal manera que no interfieran con el tubo de las bolsas en las escalas. Las bolsas son verificadas para asegurar que están colgando de forma recta en escalas de peso, y el tubo del equipo desechable es comprobado en caso de haya torceduras y pellizcos. A continuación, la pinza del tubo de la bolsa de 2.000 ml (Bolsa A) se cierra; el tubo de las Bolsas B y C se verifica que estén abiertas. Después de que el set desechable se ha instalado correctamente, se selecciona "OK" en la pantalla "Install Set". Se llevaron a cabo 45 20 pruebas internamente para verificar la correcta instalación equipo desechable.

Instalación del set desechable del tampón y cebado.

50 **[0207]** La bolsa de cebado de DPBS/ HSA/citrato está conectada a la línea de pico del tampón del set desechable. Mientras sostiene la bolsa de tampón en posición vertical, a la bolsa se le da una palmada para eliminar el aire de la línea de conexión del puerto. Un peso de 1 kg se une a la escala del peso 6, y la bolsa de tampón se cuelga en el peso de 1 kg. El peso combinado ha de ser entre 3250 g a 7000 g. Las escalas de peso y valores de presión se registran en la pantalla "Device Status", y se selecciona "OK". A continuación se prepara el Sistema de Selección Celular Magnética Isolex 300i al set desechable con tampón.

55 **[0208]** Las escalas de peso y valores de presión de la pantalla "Device Status" se registran después de que el cebador principal está completo. El Isolex 300i se mantiene en espera hasta que las células del paciente se han recibido y están listas para ser añadidas. La instalación de set desechable y cebado se inicia una hora antes de la llegada de las células del paciente, por lo que el procesamiento celular puede comenzar inmediatamente después de recibirlas.

60 **[0209]** Después de recibir la bolsa de envío de aféresis linfática del paciente, limpie el puerto en la bolsa de envío, se limpia con un paño estéril y 70% de alcohol isopropílico, y luego se traslada a una cabina limpia de bioseguridad. Cuando se usa una línea de transferencia pico a pico, el contenido de la bolsa se transfiere a un frasco estéril de 500 ml (Nalgene, número de catálogo 2.019 -0.500). Se prepara a continuación una dilución 1:50 de células mediante la mezcla de 0,02 ml de suspensión de células con ácido acético 0,98 ml de 2%. A

continuación se cuentan las células para determinar el recuento de células PBMC.

Recuento celular del producto de aféresis linfática.

5 **[0210]** Utilice una pipeta de 50 ml para dispensar las células suspendidas en el plasma en los tubos de 50 ml cónicos para centrífuga (45 ml/tubo). Las células se sedimentan por centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm (200 x g), con el freno apagado. El número de PBMCs se calculan multiplicando la concentración de células por el volumen total. Después se agrupa el sobrenadante de plasma (40 ml/tubo) en una botella de 500 ml estéril (Nalgene; número de catálogo 2019-0500) para ser utilizado para el procesamiento de plasma como se describe a
10 continuación. Los sedimentos se re-suspenden en el plasma que queda en los tubos de 50 ml, y la piscina en un botella estéril de 250 ml (Nalgene; número de catálogo 2019-0250). A continuación, se mide el volumen. Después se añaden aproximadamente 150 ml de citrato DPBS/HSA, y el volumen total se calcula dividiendo el número total de células por el nuevo volumen de la celda.

15 *Aislamiento de células CD8⁺.*

[0211] El fenotipo y la prueba de pureza de CD8 se determina mediante tinción de la superficie celular con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia y análisis por citometría de flujo. Análisis de dos colores en el citómetro de flujo FACScan, se lleva a cabo de acuerdo con el panel de anticuerpos monoclonales que se
20 enumeran a continuación. Marcadores para la caracterización del producto incluyen: CD3 (linfocitos T), CD4 (células T auxiliares), CD8 (células T citotóxicas), CD14 (monocitos), CD19 (células B), CD16 (células NK) y CD15 (granulocitos). Las células usadas para las pruebas de citometría de flujo se lavan en tampón FACS (PBS que contiene BSA y azida de sodio) y se incubaron con los anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia apropiados a 4 °C durante 15 - 30 minutos, protegido de la luz. Posterior a la incubación, las células teñidas se
25 lavaron y se re-suspendieron en tampón FACS. Las células teñidas se almacenan en hielo, protegidas de la luz, y se ejecutan en el citómetro de flujo dentro de las 2 horas de tinción. Alternativamente, si las muestras no se pueden analizar dentro de las 2 horas, las muestras se fijan usando una solución de 0,5% de paraformaldehído en DPBS y se almacenan durante un máximo de una semana a 4 °C en la oscuridad. Un total de 10.000 eventos son recogidos para cada muestra. Los datos se analizan y se informa el porcentaje de células que son positivas para cada
30 marcador.

[0212] Un total de 1×10^8 células se pipetearon para el análisis FACS de la tipificación de HLA en un tubo cónico estéril de 50 ml. La concentración de células (células/ml) se registra en el tubo. Aproximadamente 6×10^7 células se
35 dejan de lado en un tubo estéril de 15 ml para ser congelados para archivar los linfocitos del paciente. Las células se centrifugan y se congelan al mismo tiempo que se congelan las células no-CD8 (véase más adelante para el aislamiento y tratamiento de las células no-CD8). Aproximadamente 1×10^7 células se dejan de lado en un tubo estéril de 15 ml para análisis FACS antes de la selección positiva de las células CD8 + mediada por Isolex 300i .

[0213] Los reactivos se añaden a la Isolex 300i y los datos registrados de acuerdo con los siguientes pasos, y se
40 pueden añadir mientras que las células del paciente son centrifugadas. Una vez que aparezca la pantalla "Add Release Agent", el septo de la Bolsa 2 se limpia con toallitas de alcohol estériles. Se utiliza una aguja y una jeringa para agregar 20 ml de tampón citrato DPBS/HSA a la bolsa 2. El agente de liberación se reemplaza con tampón citrato DPBS/HSA, y luego se presiona "OK". Una vez que aparezca la pantalla "Add Antibody", el septo de la Bolsa
45 3 se limpia con toallitas de alcohol estériles. La solución 37B1A anticuerpo monoclonal anti-CD8 se prepara mezclando 0,200 ml de 37B1A de stock a 10 mg/ml con 2,30 ml de citrato DPBS/HSA. Usando una aguja y una jeringa, se añade la solución diluida 37B1A anti-CD8 mAb a la bolsa 3, y se pulsa "OK". Una vez que aparezca la pantalla "Add Beads", el septo de la cámara se limpia con toallitas de alcohol estériles. Las perlas magnéticas (Nexell 4R9950, o equivalente) se lavan mediante la transferencia del contenido de un vial (10 ml) en un tubo de 50 ml y añadiendo 10 ml de citrato DPBS/HSA. Las cuentas se separaron durante 2 minutos en un imán MPC-1
50 colocando el tubo en el imán. El sobrenadante se retira con una pipeta, mientras que las perlas son atraídas hacia un lado del tubo. El tubo de perlas se retira del imán y las perlas suavemente se resuspenden en 10 ml de citrato DPBS/HSA de tal manera que la formación de espuma se evite. Usando una aguja y una jeringa de 20 ml, las perlas se añaden a la cámara, y luego se presiona "OK".

[0214] A continuación se sella el tubo del recipiente de 300 ml Transfer Pack (Baxter Fenwal-; número de catálogo 4R2014). En una cabina de bioseguridad, la suspensión de células de la botella de 250 ml se transfiere en el Transfer Pack de 300 ml utilizando una jeringa de 60 ml (émbolo eliminado) conectado a un equipo de infusión de
55 componentes de la sangre. A continuación se cierra el tubo del equipo de infusión. La suspensión de células se transfiere entonces desde el recipiente de Transfer Pack a la bolsa de 1000 ml Isolex 300i incluido en el set desechable (Nexell; número de catálogo 4R9850), utilizando el pico y el filtro de la sangre en línea para eliminar grumos de células. Después se sella el tubo de la bolsa que contiene la suspensión de células.

Selección de células CD8⁺.

65 **[0215]** La bolsa celular Isolex 300i se conectada usando la espiga del set desechable Isolex y se cuelga al peso

número 1 de la escala, se registran las escalas de peso y valores de presión en la pantalla 'Device Status' del procesador celular. Se presiona 'OK', y se confirma que la abrazadera de la bolsa de residuos A (bolsa de recolección de no-CD8) esté cerrado. La abrazadera de bolsas de residuos B y C se abre antes de iniciar la secuencia de selección positiva. Se deja proceder al Isolex a lavar las plaquetas durante 15 minutos antes de la incubación de las células con el mAb anti-CD8 (37B1A). Después de la terminación del lavado de las plaquetas y durante la incubación de anticuerpos, el peso de las bolsas de células (escala de peso No.5) se registra. Después de la incubación del anticuerpo, se deja proceder al Isolex a lavar el exceso de anticuerpo y luego transferir las células en la cámara que contiene las perlas magnéticas, donde se produce la mezcla durante 30 minutos y hacer reiniciación. Durante la formación de rosetas de las células (después que la Isolex acaba de enjuagar todos los tubos) se abre la pinza de bolsa de residuos A, y las abrazaderas de bolsas de desecho B y C se cierran. El volumen de la cámara se graba durante la reiniciación. Después que la formación de rosetas está completa, las rosetas son recolectadas magnéticamente contra el lado de la cámara y las células non-CD8 son drenadas a la bolsa de residuos A. Se permite que el sistema Isolex proceda al lavado de las rosetas tres veces con aproximadamente 100 ml de tamón de citrato DPBS/HSA. Después del tercer y último lavado, se presiona "Stop" en el teclado Isolex y la cámara se sella. La cámara que contiene las células CD8+ en roseta se retira de la máquina Isolex. La cámara y el tubo se rocean con alcohol estéril y se colocan en una cabina de bioseguridad (p. ej., una campana), y se añaden 15 ml de citrato DPBS/HSA a través del septo de la cámara limpia con alcohol estéril. La cámara está entonces inclinada hacia atrás y hacia adelante para volver a suspender las rosetas, y la suspensión se transfiere a un tubo de 50 ml utilizando una jeringa de 30 ml equipada con una aguja calibre 16. La transferencia se repitió dos veces y las suspensiones transferidas son agrupados. Después se separan las cuentas durante 5 minutos en un imán MPC-1, y el sobrenadante se desecha.

Elución de células CD8⁺ con elución de péptido CD8.

[0216] Las rosetas lavadas se re-suspendieron con 6 ml de citrato DPBS/HSA y se transfirieron a un tubo cónico de 15 ml estéril, en el que 0,9 ml de elución de péptido CD8 (AAEGLDTQRFSG; SEQ ID NO. 83) se añade a 10,0 mg/ml (concentración final de péptido: 1,5 mg/ml). La solución roseta/péptido se incuba a 37 °C durante 30 minutos en un mezclador Dynal que gira a 20 rpm. La solución incubada se mezcla vigorosamente con una pipeta de 5 ml. La pipeta se enjuaga dos veces con 2 ml de citrato DPBS/HSA, y el volumen enjuagado se añade al tubo de 15 ml. Las perlas se separan de las células en un imán MPC-6 durante 3 minutos y el sobrenadante recogido, el cual contiene las células CD8+, en un tubo cónico de 50 ml. Las perlas se lavaron tres veces con 10 ml de citrato DPBS/HSA, y la etapa de separación con el imán se repite. Los sobrenadantes que contienen las células CD8+ liberadas se mezclan junto con el primer sobrenadante. Las perlas perdidas se eliminan de la suspensión de células agrupadas mediante la separación con el imán MPC-1 durante 5 minutos. El sobrenadante combinado se transfiere a un tubo cónico de 50 ml y se mide su volumen. Después de la dilución al 1:20 con azul de tripano (suspensión de células de 20 ml + 380 ml de azul de tripano) las células (viables y muertas) se contaron usando un hemocitómetro. La proporción de células vivas (no-teñidas por azul de tripano) de las células totales (células teñidas más no-teñidas) el porcentaje calculado se define como viabilidad celular. Las células de aproximadamente 4.0×10^7 se retiran para una prueba inmediata mediante análisis FACS, caracterización celular y la detección del virus, se dividieron en partes iguales en dos tubos estériles de 15 ml cónicos. Las restantes CD8+ se sedimentan por centrifugación durante siete minutos a 1700 rpm (600 x g). El sobrenadante se aspiró con una pipeta de 25 ml, y luego se centrifugó durante un minuto a 1700 rpm (600 x g) para sedimentar las células. El exceso de sobrenadante se retiró con una pipeta de punta fina. El sedimento celular se re-suspendió con 14 ml de citrato DPBS/HSA, se transfirió a un tubo cónico estéril de 15 ml, y se centrifugó de nuevo durante siete minutos a 1700 rpm (600 x g). El sobrenadante se aspiró de nuevo con una pipeta de 10 ml, se centrifugó durante un minuto a 1700 rpm (600 x g) para sedimentar las células y se eliminó el exceso de sobrenadante utilizando una pipeta de punta fina. A continuación se re-suspendió el sedimento celular en un frasco T75 a una concentración de 3.3×10^6 células/ml usando medio completo RPMI suplementado con 10% de suero autólogo inactivado por calor (HIAS), preparado como se ha descrito anteriormente. Se lleva a cabo el análisis FACS de una muestra de células y los resultados se registran.

Recolección de células no-CD8.

[0217] Después que los lavados de roseta se completaron como se describió anteriormente, la bolsa de residuos A se sella, se limpia con alcohol estéril y se transfiere a una cabina de bioseguridad (p. ej., una campana). La bolsa de residuos se pincha con una punta estéril y conector de punta, la suspensión celular se recoge en un frasco pesado y esterilizado previamente 500ml (Nalgene, número de catálogo 2019-0500). Después de la recolección, la botella se pesa de nuevo para estimar el volumen de suspensión de células no-CD8 basado en la aproximación de que 1 g = 1 ml. El resto de bolsas y los tubos del set Isolex se desechan. Luego se añade DPBS para que el volumen de suspensión de la célula no-cCD8 llegue hasta 480 mL y se mezcla. Véase a continuación si el volumen de la suspensión de células no-CD8 es mayor a 480 ml antes de la adición de DPBS.

Separación y cosecha de células no-CD8.

[0218] Con el fin de separar las células no-CD8, se pipetea 15 ml de Ficoll-Paque PLUS (Pharmacia; número de catálogo 17-1440-03) en cada uno de los dieciséis tubos de centrifuga de 50 ml. Si el volumen de la suspensión de

células no-CD8 recolectados como se describió anteriormente es mayor a 480 ml, el volumen de suspensión no-CD8 se divide entre 16 para calcular el volumen de entrega en cada tubo de centrifuga de 50 ml. Aproximadamente 30 ml (o 1/16a del volumen total como se describe anteriormente), de la suspensión de células no-CD8 se pone cuidadosamente en capas en la parte superior del Ficoll-Paque PLUS. Los tubos se colocan en cubos de centrifuga y se balancean cuidadosamente mediante la adición de agua en los cubos. Los cubos balanceados se centrifugan a 2000 rpm (800 x g) durante 20 minutos a temperatura ambiente con el freno apagado. Con una pipeta de 10 ml, se recolectan las células no-CD8 de la parte superior en la capa Ficoll-Paque PLUS (p. ej., entre 13 y 15 ml/interfaz) y el material se translada a los doce tubos cónicos de 50 ml, aproximadamente 20 ml máximo de la suspensión celular por tubo. Cada tubo se llena con 50 ml con DPBS. A continuación los tubos se centrifugan durante 10 minutos a 1700 rpm (600 x g) con el freno. El sobrenadante se aspira y se desecha, los sedimentos celulares se re-suspenden en un total de 200 ml de tampón citrato DPBS/HSA, y las células re-suspendidas se transfieren a 4 x 50 ml tubos estériles y se centrifugan durante siete minutos a 1700 rpm (600 x g). Los sobrenadantes se aspiran de nuevo y se desechan. Los sedimentos celulares se re-suspendieron en 50 ml de tampón citrato DPBS/HSA y se homogeneizan. A continuación, el homogeneizado se hace pasar a través de un filtro estéril para células Falcon 2350 para eliminar los grumos de células.

Preparación de muestras de células.

[0219] El homogeneizado preparado de células no-CD8 como se describió anteriormente se diluye en ácido acético 2% en una proporción de 1:100 (10 ml de suspensión celular + 990 mL de ácido acético) con el fin de lisar los glóbulos rojos restantes. Después se cuentan las células con un hemocitómetro. Por análisis FACS aproximadamente 2 x 10⁶ células. El análisis se lleva a cabo dentro de las dos horas, o fija. Una vez que el análisis FACS se realiza en la muestra de células, se registran los datos. El resto de las células no-CD8 se sedimentan por centrifugación durante 7 minutos a 1.700 rpm (600 xg), el sobrenadante se aspira y el sedimento se re-suspende a una densidad de 1 x 10⁸ células/ml en medio de congelación, que es 5% de DMSO, 47% de Pentaspan y 48% de suero autólogo inactivado por calor (preparado como se describió arriba). Aproximadamente se prepara 2 ml de medio de congelación adicional para usarlo como una sensor de temperatura. El medio de congelación se coloca entonces en hielo hasta que esté listo para su uso. La suspensión celular se distribuye en viales de congelación Nunc en aproximadamente 1,0 ml alícuotas (valor de unos 10 viales), y las células restantes se distribuyen en alícuotas de 4,0 ml. Un vial adicional que contiene 1,0 ml de medio de congelación se prepara para su uso como sensor de temperatura del sistema de congelación. Todos los viales, incluyendo el vial sensor de temperatura, se coloca sobre hielo. Como se ha descrito anteriormente, los linfocitos 6 x 10⁷ que se pusieron a un lado se sedimentan por centrifugación durante siete minutos a 1700 rpm (600 x g), y el sobrenadante se aspira. Entonces el sedimento celular se re-suspendió en 6 ml de medio de congelación. Los viales Nunc de congelación están etiquetados con el número de protocolo y la información del paciente, y la suspensión celular se distribuye en los viales en alícuotas de 1,0 ml aproximadamente (valor de unos 6 viales). Los viales se colocan en hielo.

Estimulación primaria de células CD8⁺ con xCPAs de DROSOPHILA

[0220] La estimulación de las células CD8⁺ se realiza inmediatamente después de la finalización del procedimiento de selección de células CD8⁺ descrito anteriormente. La suspensión de células CD8⁺ preparadas como se describió anteriormente, se mezcla en 3.3 x 10⁶ células/ml en medio RPMI 1640, que se complementa con L-glutamina, aminoácidos no-esenciales, piruvato de sodio y una solución de HEPES, conteniendo 10% de suero autólogo, con la suspensión del péptido-cargado de xCPAs de *Drosophila*, preparado y cargado de péptido como se describió anteriormente, en una proporción de una xCPA a diez células CD8⁺. Esto corresponde a aproximadamente 0,1 ml de suspensión de xCPA por cada 3,0 ml de suspensión de células CD8⁺ (1:30 factor de dilución). Entonces, el número de frascos necesarios se determina dividiendo el volumen (en ml) de la suspensión mezclada de células CD8⁺ y xCPA entre 15 ml. Se pegan etiquetas de colores con códigos a los frascos T75 (Costar 3376) y se marcan con el número del paciente, la fecha y volumen. La suspensión mezclada de células CD8⁺-xCPA, conteniendo células CD8⁺ y xCPA a continuación se homogeneiza por agitación, y el homogeneizado se distribuye en los frascos por igual. Se añade no menos que 15 ml de suspensión celular a cada frasco. A continuación los frascos se colocan en posición vertical en un incubador humidificado a 37 °C con 5% de CO₂ y se incubaron durante cuatro días.

[0221] En el cuarto día del proceso, el cultivo celular se muestrea para la producción de gamma IFN, y se añaden IL-2 e IL-7 a la concentración final 20 U/ml y a 30 U/ml respectivamente. En primer lugar, 3 ml del sobrenadante de suspensión celular se retira de tres frascos (0,9 ml total) y se coloca en un tubo Eppendorf. El tubo Eppendorf se hace girar durante dos minutos en una microcentrifuga. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo Eppendorf y se almacena a - 80 °C. Se calcula a continuación la cantidad de cada stock de citoquina requerido: las citoquinas se diluyeron a 1:1.000 de la concentración del stock, y un volumen apropiado de ésta dilución de stock se añade a las células en RPMI sin suero (0,5 ml / frasco). Una vez completado este cálculo, los de citoquinas se retiran del congelador a - 80 °C y se descongelan rápidamente a 37 °C. Las citoquinas se mantienen en hielo una vez descongeladas, y se usan dentro de las dos horas de la descongelación inicial. Los tubos de citoquinas restantes se colocan a - 80 °C. Las citoquinas se desechan después de un ciclo de congelación / descongelación. Las citoquinas diluidas en medio se distribuyen a cada frasco, y cada frasco se devuelve a la incubadora.

Primera re-estimulación de células CD8⁺ cebadas con células adherentes non-CD8

5 **[0222]** Las xCPA cargadas con péptido cebadas con células CD8⁺, que son células efectoras, se volvieron a
 10 estimular con células adherentes (células no-CD8) cargadas con péptido en el día 6 o 7 en una proporción de 1 a 2
 células adherentes a 10 células efectoras. En primer lugar, las células se agruparon para la re-estimulación en el
 día 6 del proceso. Los frascos T75 de células efectoras se retiraron de la incubadora y se inspeccionaron visual y
 15 microscópicamente para una posible contaminación. Ningún frasco identificado como contaminado se descarta
 antes de la re-estimulación de las células. Las células efectoras no contaminadas se pipetea en un frasco T225
 con tapón aerado, y se cuentan las células con un hemocitómetro después de diluirlas 1: 4 en azul de tripano
 (muestra de células de 50 ml + 150 ml de azul de tripano). El volumen de suspensión celular equivalente a
 20 aproximadamente 15 x 10⁶ células efectoras utilizado para las pruebas de micoplasma (método de cultivo 28 días;
 se describe a continuación). Frascos con las células restantes se devuelven a la incubadora en posición vertical
 hasta que esté listo para seguir procesando.

Preparación de células efectoras cebadas para re-estimulación.

20 **[0223]** Se re-estimularon hasta 4 x 10⁸ de células efectoras cebadas CD8⁺. El volumen requerido para suspender
 la cantidad de células efectoras cebadas a ser re-estimuladas se calcula en 2 x 10⁶ células/ml . El volumen de
 suspensión celular calculado se divide entre 15 -18, lo que representa 15 ml-18 ml de alícuotas, con el fin de
 25 determinar cuántos frascos T75 con células adherentes deben ser preparados para el procedimiento de re-
 estimulación. Las células efectoras cebadas CD8⁺ se cosechan ya sea durante el procedimiento de adherencia o el
 procedimiento de péptido-pulsantes para las células adherentes, como se describe a continuación. El exceso de
 suspensión de células efectoras puede ser congelado para su uso posterior por centrifugación a 1700 rpm durante
 30 siete minutos, eliminando el sobrenadante, y re-suspendiendo los sedimentos celulares a una concentración de 1 x
 10⁸ células/ml en solución de congelación (DPBS que contiene 10% de DMSO y 5% HSA), que ha sido
 previamente enfriado en hielo antes de la adición a los sedimentos celulares. Una vez que las células se re-
 suspenden con la solución de congelación pre-refrigerada, la re-suspensión se divide en alícuotas en un número
 adecuado de viales de congelación, y los viales de congelación se colocan después en un módulo de Preservación
 Cryo StrataCooler que ha sido pre-enfriado a 4 °C. El módulo de Preservación StrataCooler Cryo se transfiere a
 35 continuación a un congelador a - 80 °C y se deja durante la noche. El día siguiente, los viales se transfieren a un
 congelador a -140 °C.

Preparation de las células CD14⁺ non-CD8 para re-estimulación.

35 **[0224]** El rango del número de células CD14⁺ no-CD8 necesarias en el procedimiento de re-estimulación se
 determina multiplicando el número de células efectoras CD8⁺ cebadas para re-estimular por 0.1 y 0.2, de tal
 manera que se logrará una relación de aproximadamente 1 a 2 células CD14⁺ no-CD8 a 10 células efectoras
 40 cebadas CD8⁺ . El rango del número de células no-CD8 a descongelar se calcula entonces dividiendo ambos
 números de células CD14 + no CD8 necesarias por el porcentaje de células CD14⁺ no-CD8 presentes en la
 fracción no-CD8 tal determinada por citometría de flujo, como se describió arriba. Los números se redondean a 1
 x10⁸ células más cercanas. Las células autólogas no-CD8 que anteriormente se congelaron a 1 x10⁸ células/vial
 (véase más arriba) se descongelan rápidamente en un baño de agua a 37 °C. Las células descongeladas se lavan
 45 mediante la transferencia de hasta cinco viales en un tubo cónico de 50 ml y añadiendo lentamente 9,0 ml de RPMI
 completo por cada ml de células congeladas. Una muestra de 20 ml de la suspensión celular a partir de uno de los
 tubos se diluye con 180 ml de azul de tripano (es decir, dilución 1:10), y se determina el recuento de células
 viables. El número total de viable, descongelado de células no-CD8 se determina a continuación multiplicando el
 total del volumen descongelado de la suspensión de células no-CD8 por el recuento de células determinado para la
 50 muestra de 20 ml. El porcentaje de recuperación también se determina dividiendo el número de células viables
 entre el número teórico de células descongeladas. Esta recuperación% se utiliza en la re-estimulación posterior y
 los procedimientos de expansión no específicos, se describen a continuación. El número viable de células no-CD8
 recuperadas se confirma estar dentro del rango de células no-CD8 requeridas como se determinó anteriormente.
 Si es necesario, se descongela un vial adicional de células no-CD8 y se cuenta con el fin de lograr esta cantidad
 55 requerida. La suspensión celular se transfiere en tubos cónicos estériles de 50 ml y se sedimenta por centrifugación
 durante siete minutos a 1500 rpm (450 x g). Los sobrenadantes se aspiran y se desechan. Se prepara un volumen
 de RPMI completo suplementado con 10% de suero autólogo inactivado por calor (HIAS) y β2 microglobulina a 5,0
 mg/ml (dilución de 1: 200 de stock 1.0 mg/ml) suficiente para añadir en 3.5 ml por frasco de células efectoras
 CD8⁺ para ser re-estimuladas, además de un extra de 1,0-1,5 ml. Los sedimentos de células no-CD8 se re-
 60 suspenden con este medio y se agrupan en un único tubo cónico estéril de 50 ml. El tubo cónico de 50 ml que
 contiene la suspensión celular no-CD8 se coloca en una bolsa ziploc y se irradia con gamma a 5.000 rads.
 Después de la irradiación, las células no-CD8 se regresan a la cabina de bioseguridad.

Adherencia y carga de células no-CD8 con péptidos de melanoma.

[0225] Los péptidos de melanoma utilizados en la estimulación primaria de las células CD8+ se añade a la concentración final de células irradiadas a 30 mg/ml (dilución de 1: 333 de stock 10.0 mg/ml en DMSO). La mezcla de suspensión celular celular con péptido (3,5 ml/frasco) se distribuye después en frascos T75 con tapones de ventilación (Costar 3376) y se incuban en posición vertical durante dos horas a 37 °C en 5% de CO₂ para permitir que las células adherentes se peguen a la superficie de plástico. Las células no adherentes se desalojan pipeteando suavemente el sobrenadante contra la capa de células adherentes con una pipeta de 5,0 ml y las células desalojadas se desechan. El resto de las células adherentes se lavan pipeteando 5 ml de DPBS en cada frasco y luego se desecha el lavado. Se prepara un volumen de medio Leibovitz L15 suplementado con 1% HSA (dilución de 1:25 de stock al 25%), 5,0 mg/ml de β 2 microglobulina (dilución de 1: 200 del stock al 1,0 mg/ml) y 30,0 mg/ml de mezcla de combinación melanoma péptidos (dilución de 1: 333 de stock al 10,0 mg/ml) suficiente para suministrar 3,5 ml por frasco de células adherentes. A cada frasco se añade entonces 3,5 ml del medio, y los frascos se incuban a continuación en posición vertical durante 90 minutos a temperatura ambiente en una cabina de bioseguridad.

Incubación de células efectoras CD8⁺ cebadas con células adherentes no-CD8 cargadas con péptido.

[0226] El estímulo primario de células efectoras CD8+ preparadas como se describió anteriormente se cosechan para la reestimulación con células adherentes no-CD8+ calculando primero el volumen total necesario para ajustar las células efectoras CD8+ que quedan en el frasco T225 a 2,0 x 10⁶ células/ml. Los frascos T225 que contienen células efectoras CD8+ se retiran de la incubadora y se colocan en una cabina de bioseguridad (p. ej., una campana). Con una pipeta, se retira suficiente suspensión celular de las células que se agruparon en el frasco T225 para dejar un tercio del volumen total, se ajustó a 2.0 x 10⁶ células/ml. El resto de la suspensión celular se coloca en una cantidad apropiada en tubos cónicos de 50 ml para centrifuga. La suspensión celular en los tubos cónicos de 50 ml se centrifuga durante siete minutos a 1700 rpm (600 x g), y se retira el sobrenadante con una pipeta. Este sobrenadante, que está en medio condicionado, se retiene para hacer pruebas de micoplasma, como se describe a continuación. El exceso de suspensión de células efectoras puede ser congelado para su uso posterior por centrifugación a 1700 rpm durante siete minutos, eliminando el sobrenadante, y re-suspendiendo los sedimentos celulares a una concentración de 1 x 10⁸ células/ml en solución de congelación (DPBS que contiene 10% de DMSO y 5% HSA), que ha sido previamente enfriado en hielo antes de la adición a los sedimentos celulares. Una vez que las células se re-suspenden con la solución de congelación pre-refrigerada, la re-suspensión se divide en alícuotas en un número adecuado de viales de congelación, y los viales de congelación se colocan después en el Modulo de Preservación StrataCooler que ha sido pre-enfriado a 4 °C. El Modulo de preservación StratCooler Cryo se transfiere a continuación a un congelador a - 80 °C y se deja durante la noche. El día siguiente, los viales se transfieren en un congelador a - 140 °C.

[0227] Usando un volumen de medio equivalente a 2/3 del volumen final, las células efectoras sedimentadas se re-suspenden en RPMI completo fresco 10% suplementado con 10% de HIAS, IL-2 a 20 U/ml e IL-7 en 30 U/ml, y se añade a las células que quedan en medio condicionado en el frasco T225. El medio procedente de los frascos T75 cubiertos con células adherentes autólogas pulsadas con péptido se aspira en una cabina de bioseguridad (p. ej., una campana). La suspensión de células efectoras luego se pipetea en los frascos cubiertos, 15 -18 ml/frasco, según lo calculado anteriormente. Los frascos se regresan a la incubadora y se incuban a 37 °C, 5% de CO₂ durante tres o cuatro días, dependiendo de si la estimulación xCPA se realizó en un miércoles o un martes, respectivamente.

[0228] La muestra reservada para las pruebas de micoplasma como se ha descrito anteriormente, se prepara a continuación, ajustando primero la muestra de prueba de micoplasma a 0.5 x 10⁶ células/ml (30 ml de volumen final) añadiendo de nuevo el sobrenadante, que está en medio condicionado, que fue guardado para las pruebas de micoplasma. A continuación la mezcla se divide en dos alícuotas una de 2 ml cada una y una alícuota de 26 ml. Cada alícuota se congela colocándola ya sea en hielo seco/isopropanol o nitrógeno líquido, sellado con Parafilm[®], colocada en una bolsa ziploc, y se almacena a - 80 °C hasta su envío en hielo seco para BioReliance para las pruebas de micoplasma.

Ajustes de densidad celular y cambios de medio después de la primera re-estimulación de células efectoras.

[0229] El ajuste de la densidad y los cambios de medio se llevan a cabo en los días 9 6 1 y 126 1 del proceso de producción de terapia celular. El procedimiento para realizar estos ajustes y cambios de medio es idéntico para todos los días, y se presenta a continuación. En primer lugar, los frascos T75 cubiertos de células adherentes que contienen células efectoras se retiran de la incubadora y se cuentan las células de un frasco para determinar el recuento de células viables mediante la preparación de una dilución de 1: 4 con azul de tripano (muestra de 50 ml de células + 150 ml de azul de tripano). Desde el recuento de células viables obtenido, el volumen total necesario para ajustar la densidad celular se calcula en 2x10⁶ células/ml. Con una pipeta, se retira suficiente suspensión celular para dejar un tercio del volumen total en el frasco. La suspensión retirada se coloca en tubos cónicos de 15 ml para centrifuga (1 tubo por frasco T75), se centrifugan durante siete minutos a 1700 rpm (600 x g), y se elimina el sobrenadante. Luego los sedimentos celulares se re-suspenden con un volumen de RPMI completo fresco

suplementado con 10% de suero autólogo y citocinas que corresponden a dos tercios del volumen total. A continuación las células re-suspendidas se agregan nuevamente a las células que quedan en el medio condicionado en los frascos T75. Los matraces T75 se regresan a la incubadora y se incuban a 37 °C, 5% de CO₂ durante tres días.

5 *Segunda re-estimulación de células efectoras CD8+ cebadas con células adherentes no-CD8 cargadas con péptido.*

10 **[0230]** Las células efectoras CD8+ cebadas que se han sometido a la primera reestimulación con células adherentes no-CD8 se preparan para una segunda reestimulación en el día 15 6 1 del proceso de producción de terapia celular. Los procedimientos para el recuento, la preparación, la irradiación, la adherencia, y la carga de péptido con melanoma de células adherentes no-CD8 de la segunda reestimulación de células efectoras son los mismos que los descritos anteriormente para la primera reestimulación. La recolección de las células efectoras CD8+ se lleva a cabo durante el período de 80 minutos de incubación de la de carga del péptido si no se ha cosechado ya durante la incubación de adherencia celular. El frasco T225 de células efectoras CD8+ agrupadas se retira de la incubadora y se coloca en una cabina de bioseguridad (p. ej., una campana). Con una pipeta, se retira un volumen de suspensión celular igual de hasta 5×10^8 células de las células agrupadas. El volumen retirado se coloca en una cantidad apropiada en tubos cónicos de 50 ml para centrifuga. Después la suspensión celular en los tubos cónicos se centrifuga durante siete minutos a 1700 rpm (600 x g), se retira el sobrenadante y se desecha. A continuación, el volumen total que se necesita para volver a suspender las células efectoras sedimentadas es de 2.0×10^6 células/ml en RPMI completo fresco (suplementado con 10% de HIAS, IL-2 a 20 U/ml e IL-7 en 30 U/ml). El exceso de células se congela en una solución de congelación como se describió anteriormente en el primer procedimiento de la reestimulación. El medio de los frascos T75 rcubiertos con células adherentes autólogas cargadas con péptido se aspira e una cabina de bioseguridad (p. ej., una campana). La re-suspensión de células efectoras luego se pipetea en los frascos cubiertos T75 en 15ml, - 18 ml por frasco. Los frascos T75 se regresan a la incubadora y se incuban a 37 °C, 5% de CO₂ durante dos días.

Ajustes de densidad celular y cambios de medio después de la segunda re-estimulación de células efectoras.

30 **[0231]** El ajuste de la densidad y los cambios de medio se llevan a cabo en los días 17 6 1 y 206 1 del proceso de producción de terapia celular. Para el ajuste de la densidad celular y el cambio de medio en el día 17 6 1 los frascos T75 cubiertos que contienen células efectoras se retiran de la incubadora y se cuentan las células de un frasco para determinar el recuento de células viables mediante la preparación de una dilución de 1: 4 con azul de tripano (muestra de 50 ml de células + 150 ml de azul de tripano). A partir del recuento de células viables obtenido, 35 el volumen total necesario para ajustar la densidad celular se calcula en 1.5×10^6 células/ml. Con una pipeta, se retira suficiente suspensión celular para dejar un tercio del total del volumen del frasco. La suspensión retirada se coloca en tubos cónicos de 15 ml para centrifuga (1 tubo por frasco T75), se centrifugan durante siete minutos a 1700 rpm (600 x g), y se elimina el sobrenadante. Luego los sedimentos celulares se re-suspenden con un volumen de RPMI completo fresco suplementado con 10% de suero autólogo y citocinas que corresponden a dos tercios del volumen total. A continuación las células re-suspendidas se agregan nuevamente a las células que quedan en el medio condicionado en los frascos T75. Los frascos T75 se regresan a la incubadora y se incuban a 37 °C, 5% de CO₂ durante tres días. El procedimiento para el ajuste de la densidad celular y el cambio de medio en el día 20 6 1 es idéntico al empleado en el día 17 6 1 exceptuando que el volumen total necesitado para ajustar la densidad celular es calculado por la densidad celular final de 2×10^6 células/ml en lugar de 1.5×10^6 cells/ml.

45 *Expansión no específica de células efectoras CD8+ por estimulación OKT3*

[0232] El día 21 6 1 del proceso de producción de terapia celular (un día antes de la expansión de células no específica), cuatro frascos T225 se cubren con OKT3 mediante la adición de 30 ml de OKT3 mAb diluido a 4,0 mg/ml en DPBS (120 ml de OKT3 solución estéril de stock con 1,0 mg/ml en 30 ml de DPBS) a cada frasco. Los orificios de ventilación de los frascos se sellan con Parafilm y se almacenan horizontalmente durante la noche a 4 C. Cada frasco T225 se utilizará para la estimulación de un total de $8-10 \times 10^7$ células efectoras. **[0233]** El día siguiente (día 2261), se preparan células efectoras CD8+ para la estimulación con OKT3 mAb. Los frascos que contienen células efectoras CD8+ se retiran de la incubadora y se inspeccionan visual y microscópicamente para una posible contaminación. Ningún frasco identificado como contaminado se desecha. Las células no contaminadas se agrupan en una botella de Nalgene de 500 ml estéril y se cuentan después de diluirlas en 1: 4 en azul de tripano (50 ml de muestra de células + 150 ml de azul de tripano). A continuación, se determina el recuento de células viables. Aproximadamente $5 - 10 \times 10^6$ células viables se reservan para la tinción de tetrámero, y otras $40 - 60 \times 10^6$ células viables se dejan de lado para las pruebas de virus de *Drosophila*. El volumen de suspensión de células efectoras a recolectar para la estimulación con OKT3, se calcula en base al número de frascos cubiertos con anticuerpo anti-CD3 y el recuento celular viable por frasco cubierto de OKT3 de $8 - 10 \times 10^7$ células efectoras. Cualquier extra de células adicionales se congelan utilizando el procedimiento de congelación descrito anteriormente. La botella Nalgene se regresa después a la incubadora.

[0234] Un número de células no-CD8 a descongelar para ser utilizadas como células alimentadoras durante la expansión celular no-específica se calcula usando una proporción de cuatro células alimentadoras no-CD8 para estimular una célula efectora CD8+. Suponiendo que la recuperación de células viables por vial no-CD8 congelado es la misma que la determinada para el primer procedimiento de re-estimulación descrito anteriormente, el número de células no-CD8 necesarias se divide entre el porcentaje de recuperación de células viables. Este número se redondea a 4×10^8 células más cercanas, ya que cada vial de células congeladas no-CD8 contiene aproximadamente 4×10^8 células. Una vez que se determinó el número de células no-CD8 requeridas, las células autólogas no-CD8 se descongelan rápidamente en un baño de agua a 37 °C. Las células descongeladas se transfieren en un número apropiado de tubos cónicos estériles de 50 ml, al que se añade 9 ml de medio completo RPMI sin suero por cada 1 ml de células descongeladas. Las células se sedimentan por centrifugación durante siete minutos a 1,500 rpm (450 x g), y el sobrenadante se aspira y se desecha. Luego los sedimentos se re-suspenden a aproximadamente $1,5 \times 10^7$ células/ml en RPMI completo suplementado con 10% de suero autólogo inactivado por calor (HIAS), y la suspensión celular se transfiere a un tubo de centrifuga estéril de 250 ml. El tubo de centrifuga que contiene la suspensión celular no-CD8 se coloca en una bolsa ziploc y se irradia con gamma a 3.500 rads. Después de la irradiación, las células no-CD8 se regresan a la cabina de bioseguridad. A continuación, se añaden las células irradiadas no-CD8 al pool de células efectoras CD8+ en la botella Nalgene de 500 ml.

[0235] Se determina el volumen total requerido para añadir 125 ml de la suspensión de células no-CD8/CD8+ en cada frasco cubierto con OKT3, y la diferencia entre este volumen total y el volumen actual de la suspensión de células no-CD8/CD8+ de la botella Nalgene se hace añaniedo medio fresco (RPMI completo suplementado con 10% de suero autólogo inactivado por calor) a la botella de Nalgene. A continuación se añade IL-2 fresco a 20 IU/ml (dilución a 1: 5000 dilución de stock en 100 IU/ml). Desde este punto en adelante, no se añade IL-7 al cultivo de frascos cubiertos con OKT3 luego se retiran del congelador, la solución OKT3 se retira de los frascos con una pipeta, y cada frasco se lava cuatro veces con 30 ml de DPBS en cada lavado. La suspensión de células no-CD8/CD8+ después es distribuida entre los frascos cubiertos con OKT3 (125 ml/frasco) e incubados horizontalmente durante dos días a 37 °C, 5% CO₂. Dos días más tarde (Día 24 6 1), los frascos se retiran de la incubadora, y la suspensión de células se recolecta de cada frasco con un rascador de células estéril de mango largo, manejando cada frasco por separado. Cada frasco contiene 125 ml de suspensión celular.

[0236] El puerto luer-fitted de una bolsa de 3L Lifecell® (Nexell; número de catálogo R4R2113) está unida a una jeringa estéril de 60 ml (sin pistón), y las abrazaderas en los otros puertos están cerrados. El contenido de cada frasco se transfiere a una bolsa separada, de modo que el número de bolsas LifeCell llenas de suspensión celular es igual al número de frascos cubierto con OKT3 de donde se derivan las células. A continuación para cada bolsa Lifecell, se añade 375 ml de medio X-Vivo10 (BioWhittaker; número de catálogo 04-743Q) y 100 (ml de stock fresco IL-2 a 100 IU/ml para lograr una concentración final de 20 IU/ml). El volumen total de cada suspensión celular en cada bolsa Lifecell es ahora aproximadamente de 500 ml. Después las bolsas Lifecell® se vuelven regresan a la incubadora y se colocan sobre una rejilla para permitir el intercambio eficiente de gases. Las bolsas se incuban durante tres días a 37 °C, 5% CO₂. **[0237]** Al final del periodo de incubación de tres días (Día 27 6 1), se añaden a cada bolsa Lifecell® 500 ml de medio X-Vivo10 (BioWhittaker número de catálogo 04-743Q). A continuación se añade IL-2 fresco a 20 IU/ml (dilución a 1: 5000 dilución de stock en 100 IU/ml). Después de la adición de medio fresco, la abrazadera en el puerto luer de cada bolsa está cerrada, la bolsa se hace girar para homogeneizar la suspensión celular, y se extrae una muestra de 5 ml de suspensión celular con una jeringa para pruebas de esterilidad, como se describe a continuación. Cada muestra se analiza por separado. Las muestras son analizadas con un máximo de dos horas de haber sido tomada. Después del muestreo, la abrazadera en el puerto luer se cierra de nuevo, y la conexión luer se tapa con una jeringa de 3 ml. Las bolsas Lifecell® se regresan a la incubadora y se colocan sobre una rejilla para permitir el intercambio eficiente de gases. Las bolsas se incuban durante 3 días a 37 °C, 5% CO₂. Al final del periodo de incubación de tres días (Día 30 6 1), se añaden 500 ml de medio X-Vivo10 (BioWhittaker número de catálogo 04-743Q) a cada bolsa Lifecell®. A continuación se añade IL-2 fresco a 20 IU/ml (dilución a 1: 5000 dilución de stock en 100 IU/ml). El volumen de cada bolsa es ahora de aproximadamente 1,500 ml. Después de la adición de medio fresco, cada bolsa se agita para homogeneizar la suspensión de células y una muestra de 2 ml se extrae con una jeringa de una de las bolsas para determinar el recuento de células viables. El recuento de células viables se determina en la muestra de 2 ml después de dilución en 1: 4 en azul de tripano (50 ml de la muestra de células + 150 ml de azul de tripano).

Prueba de muestra previa a la cosecha y liberación del producto de terapia celular

[0238] Previo a la cosecha del producto de terapia y a la liberación, el producto de terapia celular se muestrea en las pruebas BacT/Alert prueba de esterilidad, tipificación de HLA, pruebas de micoplasma por PCR, prueba de endotoxinas, pruebas de tinción de gram, detección de ADN de *Drosophila*, detección de ARN viral mediante PCR y la terapia celular fenotipo de productos así como en pruebas de actividad (incluyendo el número de células y determinación de viabilidad, determinación de fenotipo, y pureza de CD8+). Estas pruebas se realizan en varios otros pasos del proceso, en el proceso de fabricación la terapia celular, como se mencionó anteriormente y como se representa en las figuras 9A-9F.

[0239] Usando el recuento de células viables determinado en el día 306 1, el volumen de suspensión de células equivalentes a 5×10^7 células para incluirse en la muestreo se calcula a partir de cada bolsa Lifecell®. Usando una jeringa separada para cada bolsa, se retira el volumen calculado equivalente a 5×10^7 células y se coloca en frascos separados T75. Las células en los frascos son inspeccionados visualmente para el color anormal o turbulento y se comprueban microscópicamente para detectar indicios de una posible contaminación. Cualquier bolsa Lifecell a partir de la cual se detecten células contaminadas se desecha. Una muestra de 5 ml de cada uno de los frascos T75 se retira para iniciar el ensayo de esterilidad por BacT/Alert como se describe a continuación. Cada muestra se analiza por separado. Las muestras se inocularon dentro de las 2 horas tras haber sido tomadas. Las suspensiones de células restantes se agrupan en un frasco T75. El recuento de células viables en la muestra colectiva se determina después de la dilución de 1: 4 en azul tripán (50 ml de muestra de células + 150 ml de azul de tripano). Un volumen calculado correspondiente a un total de células 1×10^8 se utiliza para la preparación de ADN y ARN así como para Mycoplasma PCR ELISA como se describe a continuación. Un volumen calculado correspondiente a un total de 1.95×10^7 células se utiliza para el ensayo de CTL como se describe a continuación. Un volumen calculado que corresponde a un total de $5 - 10 \times 10^7$ células se reserva para la tinción de tetrámero como se describe a continuación. Después del muestreo, las bolsas LifeCell se regresan a la incubadora y se incuban hasta que estén listas para cosechar las células.

20

Prueba BacT/Alert para esterilidad del producto de terapia celular.

[0240] En el proceso BacT/Alert® (bioMerieux, Inc.) las pruebas de esterilidad se inician aproximadamente en el día 27 (una semana antes de la recolección de células), y aproximadamente en el día 30 (después de la última adición del medio de cultivo). La toma de muestras para pruebas de liberación también se realiza en el día 30, después de la última adición del medio del cultivo, como se describe anteriormente.

[0241] El método de prueba rápida de esterilidad BacT/Alert® es utilizado para poner a prueba el proceso y la esterilidad del producto final. BacT/Alert® es un dispositivo de diagnóstico aprobado por la FDA. Se trata de un sistema no invasivo de detección microbiana totalmente automatizado que utiliza la detección colorimétrica de la producción de dióxido de carbono para la detección del crecimiento de microorganismos. El sistema BacT/Alert® incuba, agita, y monitorea continuamente los cultivos. El BacT/Alert se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez que se introduce una botella que contiene una muestra en el instrumento, no hay necesidad de ninguna otra intervención del operador hasta que se detecte un positivo, o cuando el período de incubación de siete días se completa. El sistema consiste en un instrumento de detección, sistema informático, y frascos de cultivo aerobios y anaerobios con sensores colorimétricos incorporados.

[0242] Cuando una botella que contiene una muestra de ensayo se coloca en una célula de instrumento, un pequeño diodo emisor de luz (LED) expone el sensor situado en la parte inferior de cada botella a un haz de luz roja. La luz reflejada se recoge cada diez minutos por un fotodiodo incorporado en cada célula, donde se transforma, se amplifica y se transmite al sistema del ordenador para la interpretación. El software del ordenador genera una curva de crecimiento para cada botella, y mediante el uso del algoritmo de detección, discrimina entre la producción de CO₂ constante y velocidad acelerada de la producción de CO₂ causado por microorganismos en crecimiento. El algoritmo del software puede detectar un alto nivel de CO₂ cuando una botella se carga primero en el instrumento, o puede sentir una alta tasa de producción de CO₂, o puede medir una aceleración en la tasa de producción de CO₂. En las dos primeras mediciones detecta organismos que han crecido o están en crecimiento antes de la entrada en el instrumento. A medida que se genera CO₂ adicional dentro de la botella de cultivo, el sensor incorporado cambia de color gris oscuro a amarillo. Ya que cada muestra se compara con su propio desempeño pasado en lugar de un umbral preestablecido, verdaderos positivos se detectan rápidamente y sin aumento de falsos positivos.

[0243] El producto de terapia celular se libera condicionalmente si todas la pruebas en el proceso de BacT/Alert son negativas el día de infusión de células. El producto de terapia celular es estable durante 42 horas después de la formulación, lo que requiere su envío inmediato al sitio clínico antes de obtener resultados finales de las pruebas de esterilidad. BacT/Alert se lee 18 6 2 horas después de la inoculación del producto final. La notificación de que la lectura de esterilidad de 18 6 2 hrs del producto final fue negativo se proporcionará al sitio clínico. Esta notificación se recibe antes de la infusión celular para documentar la liberación provisional del producto de terapia celular. La versión completa se documenta después de que la muestra de producto de terapia celular es negativo después de la plena incubación de siete días.

Tipificación de HLA de producto de terapia celular.

[0244] La tipificación de HLA basado en la PCR se realiza en muestras de productos de aféresis linfática (PBMCs) y muestras de células efectoras CD8+ obtenidas a partir de producto de terapia celular cuatro días antes de la cosecha producto de terapia celular. El ADN genómico se preparó a partir de PBMCs o células efectoras CD8+ utilizando el kit Qiagen Blood AmpDNA (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Plantillas para HLA-A, HLA-A2 y HLA-DR a partir de kits de escritura Genovision (GenoVision) son preparados para la PCR. La mezcla maestra

de PCR incluidos en el kit se agrega junto con el ADN genómico purificado a cada plantilla también. Cada pozo tiene un tope y plantillas de carga en el termociclador. Los parámetros de PCR incluyen un programa de ciclo combinado 10/20. Las muestras se ejecutan en 2% geles de agarosa que contienen bromuro de etidio, y los resultados fotografiados utilizan una estación de documentación foto-UV. Los resultados de la tipificación de HLA se determinan mediante el uso de lotes específicos de interpretación y tablas de especificidad suministrados con el kit de Genovision. Antes de la liberación, se verifican los resultados de la tipificación de HLA del producto de terapia celular para la identidad con aquellas del producto inicial de aféresis linfática. La compatibilidad de HLA con las células de nuevos pacientes se confirma antes de la liberación del producto de terapia celular.

10 *Prueba de micoplasma de producto de terapia celular.*

[0245] A las muestras de productos de terapia celular se le realizan pruebas de micoplasma utilizando el kit de Roche Mycoplasma PCR-ELISA (Roche). Tanto el sobrenadante del cultivo CD8+ como el ADN genómico preparados a partir del producto de terapia celular se prueban en este ensayo. El producto de terapia celular se muestrea tal como se describe anteriormente, y las células y/o restos sedimentó por centrifugación a baja velocidad. La prueba se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes se eliminan y se centrifugan a alta velocidad para sedimentar micoplasma. Los sobrenadantes se eliminan y cada sedimento se re-suspende en 10 ml de tampón de lisis y 10 ml de agua estéril. Se añade ADN de control positivo (10 ml) a un tubo de microcentrífuga con 10 ml de tampón de lisis. Para los controles negativos duplicados, se añaden 10 ml de agua y 10 ml de tampón de lisis a cada uno de los dos tubos de microcentrífuga. Todas las muestras se incubaron a 37°C durante una hora. Después de la adición de tampón de neutralización, a cada muestra se añaden 10 ml de cada uno a 40 ml de mezcla de PCR. La PCR se ejecuta en muestras duplicadas de sobrenadantes CD8+ junto con controles positivos y negativos siguiendo el protocolo del fabricante. Se incuba un reactivo de desnaturalización (40 ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente con 10 ml de cada uno de los productos de reacción PCR. La reacción de hibridación que contiene la sonda de captura marcada con biotina se añade a cada muestra y se transfiere la mezcla al pocillo apropiado de la placa de microtitulación que contiene MTP cubierta con estreptavidina. La placa se incuba a 37 °C durante tres horas con agitación orbital a 300 rpm. Después de lavar, se añade la solución de trabajo anti-DIG-POD y la placa se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos a 300 rpm. La placa se lava cinco veces y el se incuba el sustrato TMB en la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos a 300 rpm. Se añade solución de parada y la absorbancia es medida usando un lector de placas de microtitulación a 450 nm. La muestra de prueba se considera positiva si la absorbancia medida a 450 nm es el doble de la de los controles negativos. El ensayo se considera válido si la densidad óptica de los controles negativos es de menos de 0,25 y el control positivo es > 1,2. Las muestras de prueba se consideran negativo cuando la diferencia en la absorbancia entre los controles negativos y las muestras de ensayo es inferior a 0,2. Para su publicación, el producto de terapia celular es negativa para micoplasma por prueba PCR-ELISA .

Prueba de endotoxinas.

[0246] Las pruebas de endotoxina se realizan por medio de la técnica fotométrica cinética usando el kit de ensayo de endotoxina QCL-1000 de BioWhittaker de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La presencia de endotoxina en una muestra activa las enzimas presentes en una preparación de lisado de amebocitos de *Limulus*(LAL). La actividad enzimática se detecta mediante la adición de un sustrato peptídico. La escisión de este sustrato péptido conduce a la liberación de un fragmento de color que se cuantifica colorimétricamente.

[0247] El contenido de endotoxina de un producto administrado por vía intravenosa se requiere ser ≤ 5.0 EU/kg/h. Para un individuo promedio de 70 kg, esto sería equivalente a una dosis máxima total de 350 EU. El producto de terapia celular se formula en un volumen final de 300 ml de inyección de lactato de Ringer USP/5% de dextrosa al 0,9% de cloruro de sodio/25% de albúmina de suero humano, se administra durante 30 minutos. Por lo tanto, el límite de endotoxina superior corresponde a 1,17 UE/mL de producto de terapia celular. Los niveles de endotoxina en el producto de terapia celular están por debajo de 1,0 UE/ml para la liberación del producto.

Pruebas de tinción de Gram.

[0248] La tinción de Gram se realiza usando un kit de ensayo estándar para este ensayo. Cada prueba (3 diapositivas) contiene como controles los prefijos organismos gram-positivos y gram-negativos, además de la muestra de ensayo de producto de terapia celular. Para su publicación, no hay microorganismos detectados por tinción de Gram en la diapositiva que contiene la muestra de ensayo de producto de terapia celular.

Detección de ADN de las xCPA de Drosophila y xCPA del producto de terapia celular

[0249] Las células CD8+ derivadas del producto aféresis linfática están expuestas a xCPAs de *Drosophila* desde el principio del procedimiento de fabricación. Las xCPAs de *Drosophila* son sensibles a la temperatura (cultivo mantenido a 25-27 ° C) y va a muriendo dentro de las 48 horas cuando se cultivan a 37 ° C. Un método de PCR se usa para confirmar la ausencia de ADN xCPAs de *Drosophila* en el producto final la terapia celular antes de la liberación. El ADN xCPA de *Drosophila* es detectado por PCR usando cebadores específicos para el vector de plásmido pRmHa-3 que se utiliza para transfectar células de *Drosophila* con el fin de crear la *Drosophila*

xCPAs, como se describe anteriormente.

[0250] Las secuencias de vector de plásmido pRmHa-3 están presentes en alto número de copias en xCPAs de *Drosophila* y permanecen estables dentro de las células, proporcionando un marcador adecuado para la presencia de ADN xCPA de *Drosophila* en el producto de terapia celular. La ausencia de este vector resulta en la pérdida de la expresión del antígeno recombinante, que siempre se evaluó por citometría de flujo en el día de la estimulación primaria. El vector plásmido pRmHa-3 está presente en xCPAs de *Drosophila* que expresan ácido nucleico transfectado xenogénico (p. ej., moléculas co-estimuladoras humanas y de adhesión). Las secuencias de cebadores usados para la detección de pRmHa-3 son los siguientes:

10	pRMHa-3	cebador 5' : 5'- CAGCAGCAAAATCAAGT -3'
	(SEQ ID NO.72) pRMHa-3	cebador 3' : 5'- GAAGAATGTGAGTGTGC -3'
		(SEQ ID NO.73)

[0251] El método PCR utilizado para la detección de secuencias de ADN en el vector específico *Drosophila* es una reacción en cadena de la polimerasa de una sola etapa que disminuye la incidencia de falsos positivos en el ADN de doble cadena mediante la limitación de la amplificación de PCR para 25 ciclos. Se mezclan tubos de PCR individuales que contienen 400 ng de la muestra de ADN producto de terapia celular de ensayo en un volumen de 5 ml con 45 ml de la mezcla maestra de PCR que contiene Platinum Taq polimerasa (Invitrogen) y 250 ng de cada uno de los cebadores con vectores específicos. Las muestras de ensayo y de control se colocan en un sistema GeneAmp PCR 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems) y se ejecuta la reacción PCR durante 25 ciclos. El control positivo es total es el ADN xCPA de *Drosophila*, y el control negativo total es el ADN de las células naïve CD8+ purificadas derivadas del producto de aféresis linfática antes de la estimulación de xCPA *Drosophila*. El tamaño del control positivo de fragmentos de PCR son las siguientes: beta-2-microglobulina humana (479 pares de bases), LFA-3 (817 pb) humana, B7.1 (CD80, 965 pb) humana, B7.2 (CD86 , 1098bp) humana, A2.1 (1.207 pb) humana e ICAM-I (CD54, 1696bp) humana (Figura 10A, carril 2). Al término de la reacción de PCR, las muestras se ejecutan en un gel de agarosa al 2% y los resultados fotografiados utilizan una estación de foto documentación UV. La muestra de ensayo del producto de terapia celular se considera positiva si se observan bandas específicas de ADN xCPA de *Drosophila* correspondientes a los insertos del vector (véase, p. ej., la Figura 10A, carril 2). La especificación para el producto de terapia celular es que no se detecten bandas específicas de ADN de *Drosophila* y los resultados son similares a los del control negativo en este ensayo.

[0252] La sensibilidad de detección de ADN xCPA de *Drosophila* fue determinado agregando dos veces diluciones en serie de una cantidad conocida del total de ADN xCPA de *Drosophila* en 400 ng de ADN CD8+. Se añadieron plásmido pRmHa-3 cebadores específicos del vector (250 ng de cada uno) y Platinum Taq polimerasa (Invitrogen) y se ajustó el volumen a 50 ml con agua estéril. Después de realizar un ciclo 25 de reacción PCR, fue añadido 5uL de 10X de tampón de carga de gel a 25ul de cada reacción y se ejecutó al 1% de agarosa de bajo punto de fusión/TAE gel a 50 V durante 1 hora. Fue determinado el límite del nivel inferior de detección del ADN de *Drosophila* fue de <50 pg (Figura 10B, carriles 2-15); por lo tanto, la sensibilidad de detección está en el intervalo del pictograma.

Detección de virus xCPA de Drosophila asociado al producto de terapia celular.

[0253] Como se ha descrito en el EJEMPLO 1, se determinaron tres virus de ARN específicos de insectos endógenos que se asocian con las xCPAs de *Drosophila* : 1) *Drosophila* Nodavirus (DrNV), 2) Virus *Drosophila* X (DXV), y 3) *Drosophila* HPS-1-como virus. Las xCPAs de *Drosophila* se utilizan para estimular a las células CD8+ en el inicio del ciclo de cultivo ex vivo. Por lo tanto, las células CD8+ de la muestra se probaron para confirmar la ausencia de estos virus en el producto de terapia celular final. El ARN total, purificado a partir de muestras de células del producto de terapia celular utilizando el kit Qiagen RNAeasy (Qiagen), se cebó con oligo dT y transcripción inversa utilizando transcriptasa superíndice inversa durante 50 minutos a 42 °C. Después de la inactivación de la enzima, la muestra celular xADNc células resultante del producto se trata con RNaseH durante 20 minutos a 37 °C. El producto de reacción se colocó en hielo. La concentración de CD8 + cDNA se determina por densidad óptica a 260 nm. Para los controles positivos, se clonaron secuencias específicas de virus en el plásmido pCR2.1 y el plásmido ADN linealizado para producir plantillas específicas de virus de PCR-listo. Estos plásmidos que contienen plantilla virus del número de copias conocido (20 y 100 copias virales) también se utilizan para enriquecer CD8+ cDNA a partir de muestras de productos de terapia celular, que se utilizan como controles positivos (véase a continuación). Las secuencias de cebadores usados para la detección de secuencias virales son los siguientes:

5	DXV :	hacia aselante 5'-ATCGGTGCTGCCGATGGG - 3'(SEQ ID NO.74)
	Reverso	5'-TCTAAGTTCTCATTCTCGTTTGGC-3'(SEQ ID NO.75)
	Amplicón:	178bp
	DrNV: hacia aselante	5'- GAGCCGTACGTGATGCCG -3' (SEQ ID NO.76)
10	Reverso:	5' TCATTGACGGCGAAGTGG 3' (SEQ ID NO:77)
	HPS-1 hacia adelante :	5'-ATCTTCTGCCCTCCTGGTTT- 3' (SEQ ID NO.78)
15	Reverso :	5'-ATTTGCAACCGCATACCTTC- 3' (SEQ ID NO:79)
	Ampliación:	241bp

[0254] El nivel de sensibilidad de la detección de secuencias virales en las preparaciones de ADNc de muestras de CD8+ (experimentos con muestras enriquecidas) primero es determinado de la siguiente manera. El ARN total se purificó a partir de células T CD8+. El ARN se transcribió de forma inversa con oligo dT y superíndice III transcriptasa inversa para producir ADNc de CD8-específico. Los plásmidos que contienen la plantilla viral (DXV, HPS-1 y DrNV) son linealizados y se cuantifican por densidad óptica a 260 nm. El número de copias virales por 1 mg de plásmido que contiene la plantilla viral se determina para cada virus. Los cebadores específicos del virus descritos anteriormente se utilizan en un ensayo estándar de SMART PCR con SYBR® Green 1, Hot Start Takara ADN polimerasa y 1 mg de ADNc CD8 +. Una gama de 10, 100 o 1000 copias de plantilla de virus se enriquece con la mezcla de reacción por duplicado. Las diluciones de las plantillas específicas de virus (de 20.000 copias a 2 copias) se utilizan para generar curvas de calibración estándar para PCR en tiempo real cuantitativo. Se preparan cebadores de PCR específicos de virus en una mezcla de ensayo de SMART PCR con SYBR® Green 1 y Hot Start Takara ADN polimerasa (Takara). Los controles negativos incluyen solamente ADNc CD8+ y sólo mezcla de cebadores. Las muestras se ejecutan en el sistema Cepheid SmartCycler PCR. Se llevan a cabo los análisis de curva de fusión y de curva de amplificación, y se registran los resultados en unidades de SyBr® Green 1 (SyG) detectado. La unidad del SyBr® se basa en la curva estándar para cada titulación del virus (Tabla VII).

35 Tabla VII: Spike ADN CD8⁺: Nivel de detección de secuencias específicas de virus en 1 mg de CD8 cDNA¹

40

45

50

55

60

ES 2 603 418 T3

	Protocolo	Muestra ID	Unidad SyG (10 ⁻¹⁸ g)
5			
	DXV + CD8 ⁺ Spike:	CD8 ⁺ + 10 copias	37
		CD8 ⁺ + 100 copias	256
10		CD8 ⁺ + 1000 copias	4555
		Solo CD8 ⁺	9
		Solo agua	22
15			
	DrNV + CD8 ⁺ Spike	CD8 ⁺ + 10 copias	58
		CD8 ⁺ + 100 copias	333
20		CD8 ⁺ + 1000 copias	4919
		Solo CD8 ⁺	40
		Solo agua	54
25			
	HPS + CD8 ⁺ Spike	CD8 ⁺ + 10 copias	23
		CD8 ⁺ + 100 copias	604
30		CD8 ⁺ + 1000 copias	7969
		Solo CD8 ⁺	0 (debajo de 10 ag std)
		Solo agua	0 (debajo de 10 ag std)
35	A 1 mg de CD8 + ADNc (CD8 +), se añaden cantidades conocidas de plantilla viral. La detección de 10-100 copias de cada plantilla viral por mg de CD8 + cDNA es alcanzable para los tres virus.		

[0255] Para el ensayo de liberación del producto de terapia celular, se incluyen muestras de ensayo, por triplicado, 200 ng de ADNc CD8+ en el día = 0 y 2,00 ng de de ADNc CD8+ derivada de las muestras de ensayo del producto de terapia celular. Las muestras de control positivas incluyen, por triplicado, 200 ng de ADNc CD8+ enriquecida con 20 y 100 copias de plantilla virus. Las muestras de control negativo contienen solamente la mezcla de PCR (sin plantilla) Todas las muestras se ejecutan en el Sistema Cepheid SmartCycler. El análisis de la curva de fusión y la curva de amplificación se lleva a cabo para cada uno de los tres ensayos de PCR virales. Los controles positivos darán curvas de fusión específicas y SyBr® Green 1 valores por encima del fondo (ADNc CD8+ en el día = 0). La especificación para la liberación del producto de terapia celular es que no se detecta amplificación específica del virus de *Drosophila* por encima de la observada en los controles negativos de parentesco.

[0256] La tabla VIII representa los resultados representativos de los ensayos realizados por triplicado obtenida en tiempo real cuantitativos de ensayo PCR en busca de virus adventicios identificados en naive (es decir, antes de la activación con xCPAs, como se describe anteriormente) y de muestras de productos de terapia celular de cuatro pacientes donantes (PD1, PD2, PD3 y PD4). Los resultados muestran que cada producto de terapia celular probado (Dosis final) dio negativo para cada virus que se ensayó (es decir, unidades de SyG en cada dosis final fue menor que las unidades SyG para cada muestra naive correspondiente).

Tabla VIII : Múltiple naive (no activado) y muestras de producto de terapia celular evaluado en tiempo real cuantitativo PCR (Unidades SyG)¹.

Muestra	PD1	PD2	PD3	PD4
HPS-1				
H ₂ O	0	0	0	0
Muestra naïve	0	0	0	0
Dosis final	0	0	0	0
Dosis final -20 copias	35	73	88	49
Dosis final - 10 copias	230	263	314	443
DrNV				
H ₂ O	0	0	0	0
Muestra naïve	4	31	7	4
Dosis final	5	3	5	6
Dosis final -20 copias	94	112	63	120
Dosis final -100 copias	566	349	450	431
DXV				
H ₂ O	0	0	0	0
Muestra naïve	0	0	0	0
Dosis final	0	0	0	0
Dosis final -20 copias	87	64	91	96
Dosis final -100 copias	344	319	320	381
A 0,2µg de CD8 cDNA, se añaden cantidades conocidas de plantilla viral. La detección de 20-100 copias de cada plantilla viral por mg de CD8 cDNA es alcanzable para los tres virus.				

[0257] Tablas IX y X representan los resultados representativos de los ensayos por duplicado en las muestras obtenidas de donante normal 1 (ND1). En la Tabla IX, se sometió a ensayo 0,2 mg de ADNc CD8+. En la Tabla X, se sometió a ensayo 3,0 g de ADNc CD8+. Los resultados mostrados en las tablas IX y X muestran que cada prueba de producto de terapia celular (ND1 Dosificado CD8 +) dio negativo para cada virus puesto a ensayo (es decir, unidades de SyG en cada dosis final fue menos que las unidades SyG para cada muestra naïve correspondiente). Los datos para HPS que se muestran sólo en el ensayo mostrado en la Tabla X, como el suministro de ADNc de CD8+ se agotaron en este único ensayo. Sin embargo, la evaluación rutinaria de muestras de ADNc del producto de terapia celular en esta concentración consumiría toda la muestra y prosiblemente impediría la realización de todas las pruebas requeridas y no permitiría ensayos repetidos.

Tabla IX. RT/PCR cuantitativo del donante normal 1 (ND1) naïve y células CD8+ dosificadas con cebadores específicos virales¹

Muestra	HPS (SyBr)	DXV (SyBr)	DrNV (SyBr)
ND1 Naive CD8+	0	9	0
ND1 Dosificado CD8+	0	0	0
ND1 Dosificado CD8++ 20	115	77	67
ND1 Dosificado CD8++ 100	547	286	466
Solo mezcla de cebado	0	0	0

¹Cada muestra (0,2 mg) se llevó a cabo por duplicado en un ensayo estándar de SMART/PCR con cebadores específicos del virus.

Tabla X. RT/PCR cuantitativo del donante normal 1 (ND1) naive y células CD8+ con HPS cebadores específicos virales¹

Muestra	HPS (SyBr)	DXV (SyBr)	DrNV (SyBr)
ND1 Naive CD8	0	ND*	ND*
ND1 Dosificado CD8	0	ND*	ND*
ND 1 Dosificado + 20 copias	89	ND*	ND*
ND1 Dosificado + 100 copias	361	ND*	ND*
Solo mezcla de cebado	0	ND*	ND*

¹Cada muestra (3mg) se llevó a cabo por duplicado en un ensayo estándar de SMART/PCR con cebadores específicos del virus HPS.
*ND: No determinado (véase arriba).

[0258] Utilizando las reacciones de PCR descritos anteriormente, los cebadores específicos virales de la *Drosophila* se utilizan para detectar las preparaciones CD8+ a partir de muestras de productos de terapia celular al final del proceso de cultivo *ex vivo* para la liberación de los futuros lotes de producto de terapia celular. Cada una de las reacciones de PCR virales se llevan a cabo en ADNc aislado de células de *Drosophila* frescas (control positivo), ADNc preparado a partir de CD8+ de la muestra que nunca ha sido expuesta a las células de *Drosophila* (control negativo) y el producto final CD8+ que es evaluado durante la prueba de liberación de una dosis del producto de terapia celular. El virus específico detectable del producto en el control positivo está ausente en las muestras CD8+ recogidas antes de la exposición a las células de *Drosophila* y en el producto de terapia celular para que el producto de terapia celular sea liberado.

Producto fenotipo de terapia celular y actividad de ensayos.

[0259] Las características biológicas del producto de terapia celular se evalúan por medio de mediciones del número total de células, viabilidad, fenotipo, y potencia. Además, se llevan a cabo durante los procesos de evaluaciones de número de células viables, fenotipo, CD8+ y no-CD8+ composición de células seleccionados durante todo el proceso de fabricación de productos de terapia celular.

Número de células nucleadas viables

[0260] El número de células viables se controla en varios puntos del proceso de fabricación del producto de terapia celular, incluyendo el punto previo a la liberación producto de terapia celular. Los recuentos de células viables se determinan mediante la enumeración de células diluidas en azul de tripano y cargados en un hemocitómetro (véase p. ej., más arriba). Un mínimo de 100 células son contadas bajo un microscopio. La tabla XI resume los números de células grabadas de los productos obtenidos a partir de donantes de aféresis linfática de tres paciente con melanoma, designados PD5, PD6, y PD7, y materiales celulares asociados en diversas etapas de la fabricación de productos de terapia celular así como la liberación de los procesos de prueba.

Tabla XI: Número de células de los productos de aféresis linfática, material celular asociado, y los productos de terapia celular derivados de donantes de pacientes PD5, PD6, y PD7

ES 2 603 418 T3

		Número de células (x 10 ⁶ células nucleadas)				
Días de proceso	Fraccionamiento celular	PD5	PD6	PD7	Media	Std. Dev.
5						
0	Producto de aféresis linfática (recuento total de células nucleadas)	16,000	14,000	6,630	12,210	4,934
10	Células CD8+ seleccionadas	510	464	313	429	103
	Procesamiento posterior de Ficoll de células no-CD8+ seleccionadas	5,400	11,400	4,200	7,000	3,857
15	Cultivo iniciador (estimulación de péptido específico), número de CD8+ usado para fabricación	485	438	290	404	102
6	Células en la 1 ^{ra} restimulación	300	299	410 ^(a)	336	64
20	15 Células en la 2 ^{da} restimulación	701 ^(a)	306	390 ^(a)	466	208

(continuado)

		Número de células (x 10 ⁶ células nucleadas)				
Días de proceso	Fraccionamiento celular	PD5	PD6	PD7	Media	Std. Dev.
25						
30	20 Expansión de células en OKT3	520	420	370	437	76
	Pliegue de expansión (Día 0 iniciación-Día 2061)	2.50	0.96	1.74	1.73	0.77
35	Cultivo iniciador (expansión no-específica) número de CD8+ usado para la estimulación OKT3	400	400	370	390	17
40	30 Producto de terapia celular (final)	10,000	9,600	10,300	9,966	351
	Pliegue de expansión día 3061 recuento de células 4 día 20 recuento de células (Día de iniciación 2061- día	25	24	27.8	25.6	1.97
45	^(a) Solo 300 x 10 ⁶ células que fueron re-estimuladas.					

50

55

60

65

[0261] El número de células nucleadas totales en un producto de terapia celular para la liberación es de entre 99 y 1010 células.

Viabilidad celular.

[0262] La viabilidad celular se evaluó contando las células diluidas en solución de azul de tripano en un hemocitómetro como se describió anteriormente. Se calcula el porcentaje de células viables, basado en la relación de células vivas al total de células presentes. La tabla XII presenta la viabilidad de los lotes de productos de terapia de seis células preparadas a partir de productos obtenidos de donantes de aféresis linfática de pacientes con melanoma, seis designados PD8, PD6, PD9, PD5, PD7, y PD10. La viabilidad media fue de 76,2%, con una desviación estándar de ± 2.6 (n=6). El proceso de fabricación actual de productos de terapia celular produce habitualmente el $\square 70\%$. Un producto de terapia celular posee más de 70% de viabilidad basandose en este método de ensayo a fin que el producto de terapia celular sea liberado.

Tabla XII: Viabilidad celular de los lotes de producto para seis terapias celulares

Lote	Viabilidad
-PD8	76%
PD6	72%
PD9	80%
PD5	74%
PD7	78%
PD10	77%

Producto fenotipo de terapia celular.

[0263] El fenotipo celular y la pureza de CD8 se determina mediante tinción de la superficie celular con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia y analizado por citometría de flujo. Análisis de dos colores en el citómetro de flujo FACScan, se lleva a cabo de acuerdo con el panel de anticuerpos monoclonales que se enumeran a continuación. Marcadores para la caracterización del producto incluyen: CD3 (linfocitos T), CD4 (células T auxiliares), CD8 (células T citotóxicas), CD14 (monocitos), CD19 (células B), CD16 (células NK) y CD15 (granulocitos). Las células usadas para las pruebas de citometría de flujo se lavan en tampón FACS (PBS que contiene BSA y azida de sodio) y se incubaron con los anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia apropiados a 4 °C durante 15 - 30 minutos, protegido de la luz. Posterior a la incubación, las células teñidas se lavaron y se re-suspendieron en tampón FACS. Las células teñidas se almacenan en hielo, protegidas de la luz, y se ejecutan en el citómetro de flujo dentro de las dos horas de tinción. Alternativamente, si las muestras no se pueden analizar dentro de las dos horas, las muestras se fijan usando una solución de 0,5% de paraformaldehído en DPBS y se almacenan durante una semana a 4 °C en la oscuridad. Un total de 10.000 eventos son recogidos para cada muestra. Los datos se analizan y se determina el porcentaje de células que son positivas para cada marcador. Tabla XIII representa el porcentaje de células presentes CD3+ y CD8+ en seis lotes de producto de terapia celular, derivados de productos obtenidos de donantes de aféresis linfáticas de pacientes con melanoma PD8, PD6, PD9, PD5, PD7, y PD10. La fracción de células no teñidas con CD3+ y CD8+ se cree que son las células no viables. Estos datos sugieren que el porcentaje relativo de fenotipos CD3+ y CD8+ en diferentes lotes de productos de terapia celular sigue siendo relativamente constante (véase, p. ej., los porcentajes de medias y desviaciones estándar en la Tabla XIII.)

Tabla XIII: Análisis de fenotipo para lotes de producto de terapia celular de pacientes donantes de melanoma

Paciente donante	% CD3+	% CD8+
PD8	81	89
PD6	75	86
PD9	77	76
PD5	77	82
PD7	80	82
PD10	78	80
Media %	78	82.5
Std. Dev.	2.0	4.2

[0264] Para evaluar la pureza de las células CD8+ antes y después del procedimiento de selección Isolex300i, se lleva a cabo la tinción de la superficie celular con anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia y se analizan por citometría de flujo como se describió anteriormente. La tabla XIV muestra la distribución de los productos fenotipo de aféresis linfática y los lotes de productos de terapia correspondiente derivados de donantes paciente con melanoma DP8, Pd6, y PD9. Aislamiento de células CD8 +, utilizando el separador de células Isolex, dio lugar a $82 \pm 9\%$ (media \pm SD, n = 3) de pureza, basado en la tinción anticuerpo monoclonal 37B1A con anti-CD8. Hubo niveles detectables de células CD4+ ($3 \pm 1,4\%$), CD14+ ($2 \pm 1,5\%$) y CD16+ ($5 \pm 2\%$). Esta población de células parecía estar desprovistas de células CD15+.

Tabla XIV: Distribución del fenotipo celular para los productos de aféresis linfática y lotes de productos de terapia celular correspondientes

derivados de pacientes donantes de melanoma PD8, PD6, and PD9

Muestra	Marcador de	PD8	PD6	PD9	Media	Std. Dev.
Producto de aféresis linfática	%CD3+	30	54	45	43	8.6
	%CD4+	41	42	31	38	4.3
	%CD8+	10	7	14	10	2.5
	%CD314+	22	14	17	18	2.9
	%CD19+	7	4	10	7	2.1
	%CD15+	5	1	3	3	1.4
	%CD16+	7	22	16	15	5.3
Población seleccionada CD8+ (Separación Isolex)	%CD3+	95	87	80	87	5.3
	%CD4+	5	3	1	3	1.4
	%CD8+	94	83	69	82	10.2
	%CD14+	4	0	1	2	1.5
	%CD19+	7	2	2	4	2.0
	%CD15+	0	1	0	0	0.4
	%CD16+	7	6	1	5	2.3

Potencia del producto de terapia celular.

[0265] Se lleva a cabo un ensayo de potencia de terapia celular se lleva para demostrar la actividad lítica específica como una medida de la potencia del producto de terapia celular contra células diana que se han cargado con péptidos seleccionados (por ejemplo, péptidos de acuerdo con SEQ ID Números: 5, 6, 7, 8, 9, y 70, como se describe más arriba). El método de ensayo de potencia de terapia celular es un ensayo de liberación de ^{51}Cr (véase, p. ej., Thorn et al., J. Immunol. Methods., 4(2), pp. 301-315 (1974)). Las células diana (células T2 - HLA-A2.1 +) se incuban con el isótopo radiactivo, ^{51}Cr , durante una hora. El exceso de ^{51}Cr no marcado se lava dos veces a partir de las células diana en medio de lavado.

Las muestras individuales de células T2 cargadas de cromo son entonces cargadas con péptido durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 mg/mL por péptido) con uno de los seis péptidos de melanoma (de tal manera que cada péptido diana sea probado individualmente usando una muestra independiente de células T2 cargadas de cromo), péptido-cargado control negativo de péptido, o no cargadas con péptido. El producto de terapia celular (es decir, las células efectoras CD8+ inducidas por xCPA cargadas con péptido (E)) se mezclan entonces con células diana marcadas (T) en relación E:T entre 0,4 -50 junto con las células en exceso sin marcar K562 utilizadas para neutralizar la citotoxicidad restringida de no-HLA.

Se incuba la suspensión celular a 37 °C/5% de CO₂ en un incubador durante cuatro horas. La lisis de las células diana marcadas por las células del producto de terapia celular (E) resultan en la liberación de ⁵¹Cr en el sobrenadante. Se retira post incubación 100 mL de sobrenadante de cada pocillo y se transfiere a un contador gamma. La actividad lítica (E) en presencia de cada péptido individual es expresada como el porcentaje de lisis específica como se determina por la siguiente ecuación (véase la ecuación:

$$\text{Porcentaje de lisis específica} = 100X (\text{Recuentos de muestras por minuto} - \text{Recuentos espontáneos por minuto}) / (\text{Recuentos máximos por minuto} - \text{Recuentos espontáneos por minuto})$$

Además de las células T2 cargadas con péptido, melanoma y líneas celulares de control negativo también son utilizadas como blancos después de haber sido cargadas con cromo. El procedimiento de ensayo es el mismo que el procedimiento utilizado con células T2 diana. Se detecta la lisis específica, ya sea en T2 y/o en líneas de melanoma para que el producto sea lanzado.

[0266] Los resultados de potencia (porcentaje de lisis específica en una relación 10:1 E:T) para los lotes de productos seis productos de terapia celular derivados de productos obtenidos de donantes de aféresis linfática de pacientes con melanoma PD8, PD6, PD9, PD5, PD7, y PD10 contra cada uno de las SEQ ID Números: 5, 6, 7, 9, y 70 se resumen en la Tabla XV.

Tabla XV: Potencia del producto de terapia celular (⁵¹Cr-ensayo de liberación; n=6)

Dosis	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.9	SEQ ID NO.70	Control negativo
PD8	15.8%	9.6%	45.7%	18.1%	25.8%	3.8%
PD6	30.7%	3.5%	14.6%	26.6%	18.0%	0.0%
PD9	7.0%	5.7%	10.9%	75.4%	11.9%	4.7%
PD5	29.0%	8.5%	20.6%	21.1%	21.3%	0.2%
PD7	39.4%	25.5%	85.6%	16.5%	47.2%	9.6%
PD10	26.6%	17.9%	78.7%	50.1%	33.3%	0.9%
Media	24.8%	11.8%	42.7%	34.6%	26.3%	3.2%
Std. Dev.	10.5%	7.6%	30.1%	21.4%	11.5%	3.4%

[0267] En un análisis similar, un péptido (SEQ ID NO. 8; YLEPGPVTA) se añadió a los cinco péptidos que ya se han utilizado para generar la actividad de eliminación en el producto de terapia celular. La capacidad de la SEQ ID NO. 8, utilizado solo o en combinación con otros péptidos de melanoma para generar la actividad de lisis específica, se demostró en tres donantes normales, tal como se describe en la tabla XVI.

Tabla XVI: Potencia (medida en unidades líticas) de las células efectoras de tres donantes normales (ND2, ND3, y ND4) contra péptidos de melanoma

T2+Péptido (SEQ ID NO.)	ND2	ND3	ND4
5	16.8	12.9	17.2
6	7.5	18.3	2
7	5.2	14.1	39.4
8	1.6	15.7	18.3

(continuado)

	T2+Péptido (SEQ ID NO.)	ND2	ND3	ND4
5	70	23.3	13.5	24.7
	9	31.8	59.3	37.9
	5+6+7+ 8+9+70	93.8	122.4	103.4
10	8*	75.2	61.5	72.1
* Producto generado de terapia celular contra SEQ ID NO.8 solo.				

15 Preparación del producto para infusión

[0268] Con el fin de cosechar las células de productos de terapia celular y preparar una formulación del producto de terapia celular, la suspensión de células preparada anteriormente se homogeneiza por cada bolsa inmediatamente antes de la cosecha. Dos equipos de Fenwal spike/spike de transferencia de plasma (pinzas cerradas) están entonces metidos en los puertos no utilizados en cada bolsa Lifecell®. Cada bolsa se cuelga en un gancho de elevación de la superficie de la cabina de bioseguridad. Se abren las abrazaderas en los equipos de transferencia de plasma, y las suspensiones celulares se drenan en dos botellas Nalgene estéril (1000 ml y 500 ml). Cada bolsa es colgada por separado. Después de transferir las suspensiones celulares, 5 ml de suspensión celular en cada bolsa Lifecell, se toman muestras de cada botella Nalgene 1000 ml y se colocan en un frasco T25 por separado. Las células en cada uno de los cuatro frascos T25 se comprueban visualmente para el color o turbidez inusual, y son microscópicamente inspeccionados para una posible contaminación. Las células de la bolsa Lifecell® de las muestras contaminadas correspondientes se desechan. Las células no contaminadas de los cuatro matraces T25 se reagrupan y se cuentan después de una dilución a 1: 4 con azul de tripano (50 ml de la muestra de células + 150 ml de azul de tripano). A continuación, se determina el recuento de células viables. Aproximadamente 10×10^6 células son dejadas a un lado para análisis FACS. El resto de la suspensión celular se vierte en tubos cónicos estériles de 500 ml. Después los tubos son pesados y balanceados añadiendo o retirando la suspensión celular en una cabina de bioseguridad (campana) y las células restantes se sedimentan por centrifugación durante 10 minutos a 1,700 rpm (600 x g). El sobrenadante se decanta y se desecha, los sedimentos se vuelven a centrifugar durante dos minutos a 2,000 rpm (800 x g). Cualquier sedimento restante se retira con una pipeta de 5ml.

[0269] A continuación las células sedimentadas se lavan con el siguiente tampón de lavado, que se mezcla en una botella de 250 ml estéril: 192 ml 0.9% cloruro de sodio (NaCl) para inyección, USP, y 8 ml HSA (25% solución) Buminate®. Todo los sedimentos se combinan en un total de 100ml de tampón de lavado, distribuidos en cuatro tubos cónicos de 50 ml (25ml/tubo) y centrifugados durante 10 minutos a 1,000 rpm (200 x g). El sobrenadante se aspira y se desecha, los sedimentos de células se vuelven a centrifugar durante dos minutos a 2,000 rpm (800 x g). Cualquier sobrenadante restante se retira con una pipeta de punta fina. Después cada sedimento celular se re-suspende en 25 ml de tampón de lavado y se centrifuga durante 10 minutos a 1,000 rpm (200 x g). Los sobrenadantes se aspiran y se desechan, los sedimentos celulares se vuelven a centrifugar durante dos minutos a 2,000 rpm (800 x g). Cualquier sobrenadante restante se retira con una pipeta de punta fina. Durante esta segunda centrifugación a baja velocidad, la transferencia de un paquete de 1.000 ml (Baxter, número de catálogo 4R2032) se sella y el tubo se desecha. A continuación la bolsa de transferencia se equipa con un conjunto de transferencia de plasma (Charter Medical; número de catálogo 03-220-90), y la información de identificación del paciente se fija a la bolsa de transferencia. A continuación cada sedimento celular se re-suspende, con 25 ml del siguiente tampón de re-suspensión (100 ml de volumen total), que se prepara en una botella estéril de la siguiente: 282 ml de medio de lactato de Ringer, 12 ml al 5% de dextrosa y 0,9% de sodio cloruro para inyección, y 6 ml de HSA (solución 25%) Buminate®. El tampón de re-suspensión se pipetea a fondo para separar las células agrupadas. A 70 mm filtro de nylon de células estéril (Falcon 2350) se le coloca entonces sobre la abertura de una botella Nalgene estéril de 100ml. Los agregados celulares se eliminan de la suspensión celular haciéndolos pasar a través del filtro de células. A continuación, se desecha el filtro de células. A continuación se cuentan las células viables y muertas después de la dilución en 1:50 con azul de tripano (células 20 ml + 980 ml de azul de tripano).

[0270] Fue unido el luer-lock 60-ml con jeringa al set de transferencia de plasma que va a la bolsa de transferencia 1,000 ml, y un volumen equivalente de suspensión celular de un máximo de células 1×10^{10} es transferido a la bolsa de transferencia. Después se añade el tampón de re-suspensión a la bolsa de transferencia a un volumen total de 246 ml. Todas las porciones no utilizadas de tampón de re-suspensión se desechan.

[0271] A continuación, se homogeneiza la suspensión de células por agitación de la bolsa, y se retira de la bolsa 0,5 ml de suspensión celular utilizando una jeringa de 3 ml unido al conjunto de transferencia de plasma. Esta muestra de 0,5 ml se coloca en un tubo Eppendorf estéril para su uso en pruebas de endotoxina (0,15 ml

necesarios), como se describió anteriormente. Usando una jeringa de 60 ml, 54 ml HSA (solución 25%) Buminat® se añaden a la bolsa a través del conjunto de transferencia de plasma. La nueva concentración de células se calcula entonces dividiendo el número total de células entre el nuevo volumen celular. La suspensión celular se homogeneiza de nuevo por agitación de la bolsa. Usando una jeringa de 10 ml unida al conjunto de transferencia de plasma, se retira 6.5 ml de suspensión celular de la bolsa. Esta muestra se va a utilizar para la prueba de liberación y para la crioconservación de células. Se coloca aproximadamente 0,1 ml (2-3 gotas) de suspensión celular de la muestra de 6,5 ml en un tubo Eppendorf estéril para su uso en pruebas de endotoxina (0,15 ml necesarios), como se describió anteriormente. Una parte alícuota de 0,5 ml de suspensión celular se coloca en un tubo cónico de 15 ml estéril para el análisis FACS. La muestra de células restante se transfiere a un tubo cónico de 15 ml y se centrifuga durante siete minutos a 1,700 rpm (600 x g). El sobrenadante se utiliza inmediatamente para el ensayo de esterilidad BacT/Alert, y el sedimento se guarda para análisis FACS y criopreservación. Se calcula el número de células presentes en el sedimento, y el sedimento celular se re-suspende en 6,0 ml de solución de congelación (suero autólogo 90% [HIAS] + 10% de DMSO). Entonces se calcula la nueva concentración de células dividiendo el número total de células entre el nuevo volumen celular. Luego se marcan los criotubos apropiadamente y se congelan. Los criotubos se colocan entonces en un congelador a - 80 °C en una Stratacooler y después se transfieren al día siguiente a un almacenamiento a -140 °C . Las bolsas que contienen la suspensión celular restante se colocan a 4 °C hasta que estén listas para la liberación (envío).

[0272] • La formulación del producto de terapia celular para infusión contiene CTLs autólogos (células efectoras péptido dirigido CD8+ seleccionados) en inyección de 300 ml de lactato de Ringer, USP (76% v/v), 5% de dextrosa en 9% de cloruro de sodio (4% v/v), y 25% albúmina de suero humano (20% v/v). En el momento del envío, se coloca un aparato de registro de temperatura Dickson en el contenedor de transporte. La bolsa de infusión que contiene el producto de terapia celular se coloca en el contenedor de transporte. El contenedor del envío se prepara entonces para el envío. Después de que fue recibida la bolsa de infusión de el sitio clínico, los datos de temperatura de los aparatos de registro Dickson se descargan y se representan. El periodo de caducidad del producto final es de 42 horas.

DISCUSIÓN

[0273] La reticulación proporciona un método eficaz para la eliminación de virus y mantenimiento de la función de presentación de antígenos en las CPAAs. El uso de psoraleno seguido de la exposición UV de onda larga reticula el ADN y el ARN y evita la replicación. Esto añade un nivel adicional de protección a los productos basados en células utilizadas en la preparación de medicamentos para la entrega a los pacientes, mediante la posibilidad de la inactivación de todos los virus conocidos y desconocidos que podrían estar presentes en la línea celular CPAA y la inactivación de la línea celular de *Drosophila* sin afectar a su potente función CPA. El tratamiento de psoraleno/UV inactiva los ácidos nucleicos presentes en las CPAs y el tratamiento adicional de congelación/descongelación conlleva a la "muerte" celular como se evidencia por tinción con azul de tripano). Este protocolo de inactivación/lisis garantiza la seguridad de las células de *Drosophila* como a las CPAs sin destruirlas, y en algunos casos mejorar su función CPA.

REIVINDICACIONES

1. La invención provee un método *in vitro* para crear linfocitos T activados adecuados para administrar al paciente, comprendiendo las etapas de:

5 inactivación de células presentadoras de antígeno artificial (CPAAs) mediante el tratamiento de las CPAAs con un derivado de psoraleno y exponiendo las CPAA tratadas con el derivado de psoraleno a una dosis de fotoactivación de irradiación UVA;
poniendo en contacto a los linfocitos T aislados de un paciente diagnosticado con una enfermedad,
10 trastorno o condición médica con dichas CPAAs, donde antes de o concomitante con dicha etapa de contacto las CPAAs inactivadas se cargan con al menos un antígeno peptídico;
y recolectando los linfocitos T.

2. Un método como se definió en la afirmación 1 en donde dicho derivado de psoraleno es 8-metoxipsoraleno (8-MOP), 4'-(aminomentil)-4,5', 8-psoraleno (AMT), o amotosalen (S59).

3. Un método como se definió en la afirmación 1 en donde dicho agente de reticulación comprende la exposición de células presentadoras de antígeno artificial tratadas con un derivado de psoraleno a una concentración de 1 a 100 mg/ml a la irradiación UVA a una dosis de 1 to 100 Julios/cm² de irradiación UVA por un periodo de 1 a 60 minutos.

4. Un método como se define en la afirmación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno es un cáncer, y en el que dicho antígeno de péptido al menos es un péptido antígeno asociado al cáncer.

5. Un método como se definió en la afirmación 4 en donde dichos linfocitos T son citotóxicos frente a las células diana, y el péptido es seleccionado del grupo que consiste en melanoma asociado con el cáncer, antígenos peptídicos asociados con el cáncer de ovario, antígenos peptídicos asociados con el cáncer de mama, cáncer de pulmón, leucemia, mieloma múltiple, antígenos peptídicos asociados al linfoma y antígenos peptídicos asociados al cáncer de próstata.

6. Un método como se definió en la afirmación 5 en donde dichos péptidos se seleccionan del grupo que consiste en: SILSLKEAST (SEQ ID NO.1), KMASRSMRL (SEQ ID NO.2), ALALAALLVV (SEQ ID NO.3), ALLVVDREV (SEQ ID NO. 3), ALLVVDREV (SEQ ID NO. 4), YMNGTMSQV (SEQ ID NO.5), YMDGTMSQV (SEQ ID NO.6), ITDQVPFSV (SEQ ID NO.7), YLEPGPVTA (SEQ ID NO.8), AAGIGILTV (SEQ ID NO.9), ELAGIGILTV (SEQ ID NO.10), CLTSTVQLV (SEQ ID NO.11), HLYQGCQVV (SEQ ID NO.12), KIFGSLAFL (SEQ ID NO.13), IISAVVGIL (SEQ ID NO.14), PLTSIISAV (SEQ ID NO.15), VMAGVG- SPYV (SEQ ID NO.16), VLVKSPNHV (SEQ ID NO.17), ELVSEFSRM (SEQ ID NO.18), YLSGANLNL (SEQ ID NO.19), GPLTPLPV (SEQ ID NO.20), SLLMWITQC (SEQ ID NO.21), KALFAGPPV (SEQ ID NO.22), YLETFREQV (SEQ ID NO.23), GLQSPKSPL (SEQ ID NO.24), VLLKLRRPV (SEQ ID NO.25), ELYIPSVDL (SEQ ID NO.26), SLLMWITQV (SEQ ID NO.27), ILAKFLHWL (SEQ ID NO.28), STAPPVHNV (SEQ ID NO.29), FLWGPRALV (SEQ ID NO.30), FMWGNLTLA (SEQ ID NO.31), RLVDDFLLV (SEQ ID NO.32), HLSTAFARV (SEQ ID NO.33), QLSLLM- WIT (SEQ ID NO.34), ELWTHSYKV (SEQ ID NO.35), KVAELVHFL (SEQ ID NO.36), YIFATCLGL (SEQ ID NO.37), HLYIFATCL (SEQ ID NO.38), MLMAQEALAF (SEQ ID NO.39), STLEKINKT (SEQ ID NO.40), KASEKIFYV (SEQ ID NO.41), SLLMWITQCFL (SEQ ID NO.42), ELTLGEFLKL (SEQ ID NO.43), LTLGEFLKL (SEQ ID NO.44), SLLLE- KREKT (SEQ ID NO.45), TLGEDDPWL (SEQ ID NO.46), KLGLKPLEV (SEQ ID NO.47), YLWTSAKNT (SEQ ID NO.48), STAPPAHGV (SEQ ID NO.49), GMGSEELRL (SEQ ID NO.50), SLGSPVLGL (SEQ ID NO.51), YLF- FYRKS (SEQ ID NO.52), CQQEETFL (SEQ ID NO.53), TLAKFSPYL (SEQ ID NO.54), NLTHVLYPV (SEQ ID NO.55), STFKNWPFL (SEQ ID NO.56), SLLQHLIGL (SEQ ID NO.57), FLDQRVFFV (SEQ ID NO.58), FLDQRVFVV (SEQ ID NO.59), FLDQVAFVV (SEQ ID NO.60), GLDREQLYL (SEQ ID NO.61), VMQHLLSPL (SEQ ID NO.62), QQTHGITRL (SEQ ID NO.63), LQPLSGPGL (SEQ ID NO.64), TLDRDSLYV (SEQ ID NO.65), QLYLELSQL (SEQ ID NO.66), KVLEYVIKV (SEQ ID NO.67), KVADLVGF (SEQ ID NO.68), KTWGQYWQV (SEQ ID NO.70) y VLDGLDVLL (SEQ ID NO.71).

7. Un método como se definió en la afirmación 6 en donde al menos un péptido es una mezcla de péptidos, la mezcla consiste en: YMNGTMSQV (SEQ ID NO.5), ITDQVPFSV (SEQ ID NO.7), AAGIGILTV (SEQ ID NO.9), ELAGIGILTV (SEQ ID NO.10), SLLMWITQV (SEQ ID NO.27), FLWGPRALV (SEQ ID NO.30), TLAKFSPYL (PRAME; SEQ ID NO.54) y VLDGLDVLL (SEQ ID NO.71).

8. Un método como se definió en la afirmación 1, que además comprende:

aislamiento de células T a partir de una muestra aféresis obtenida de un paciente para su uso en dicha etapa de contacto.

9. Un método como se definió en la afirmación 8, que además comprende linfocitos T activados re-estimulados dicho proceso de re-estimulación comprende:

- contactar a los linfocitos T activados con al menos una citocina, promoviendo de este modo la proliferación de células T activadas; y la incubación de células T activadas con células autólogas irradiadas no-CD8+, células adherentes no-CD8+ o células presentadoras de antígenos artificiales (CPAAs) tratadas con psoraleno/UVA , generando de este modo linfocitos T activados re-estimulados.
- 5
10. Un método como se definió en la afirmación 9 en donde al menos una citocina es seleccionada del grupo que consisten en IL-2, IL- 4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21, IFN- γ y TNF- α y en donde dichos linfocitos T activados comprenden linfocitos T citotóxicos activados.
- 10
11. Un método como se definió en la afirmación 9, que además comprenden linfocitos T activados sometidos a al menos una iteración del procedimiento de re-estimulación antes de realizar dicha etapa de generación, dicho procedimiento de re-estimulación comprende:
- 15
- poner en contacto a los linfocitos T activados con una combinación de al menos una otra citocina seleccionados del grupo que consisten en: IL-7, IL-15 o IL-21 promoviendo de este modo el crecimiento de células T activadas, la proliferación o diferenciación; e incubación de células T activadas con células autólogas irradiadas no-CD8+, células adherentes no-CD8+ o células tratadas con psoraleno/UVA para generar de este modo linfocitos T activados reestimulados
- 20
12. Un método como se definió en la afirmación 11 en donde dicho procedimiento de reestimulación comprende el contacto de los linfocitos T activados con los CPAAs de *Drosophila* en presencia de IL-2 en una concentración de 1 a 100 U/ml; IL-7 de 1 a 100 U/ml, IL-15 de 1 a 100 ng/ml y IL-21 de 1 a 100 ng/ml.
- 25
13. Un método como se definió en la afirmación 11 en donde dichas células autólogas irradiadas adherentes no-CD8+ comprenden células autólogas irradiadas adherentes CD14+.
- 30
14. Un método como se definió en la afirmación 11 en donde dichas células autólogas irradiadas adherentes no-CD8+ comprenden células autólogas irradiadas adherentes CD14+.
- 35
15. Un método como se definió en la afirmación 1, que además comprende:
- congelación y descongelación de dichas células presentadoras de antígeno artificial antes, después o concomitante con dicha etapa de inactivación y antes de dicha etapa de contacto.
- 40
16. Un método como se definió en la afirmación 1 en donde dicha inactivación de células presentadoras de antígeno artificial son incapaces de proliferarse y están esencialmente libres de contaminación.
- 45
17. Un método como se definió en la afirmación 1 en donde dichas células presentadoras de antígeno artificial expresa una molécula de antígeno humano MHC, β -2 microglobulina, y una molécula auxiliar que comprende una molécula co-estimuladora humana seleccionada del grupo que consiste en CD80 (B7-1), LFA-3 (CD58), CD83, CD86 (B7-2) o un miembro de la familia de TNF seleccionada de entre el grupo que consiste en CD70, TNF α , LT, 4-1BBL y OX40L o una molécula de adhesión seleccionada del grupo que consiste de ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, y LFA-3.
- 50
18. Aún más preferiblemente las células presentadoras de antígenos artificiales expresan el HLA humana clase I antígeno CMH molécula HLA 2.1.
- 55
19. Un método como se definió en la afirmación 18 en donde la molécula MCH clase 1 es HLA-A-A2.1 y las moléculas auxiliares son B7-1 (CD80), LFA-3(CD58), CD70 and ICAM-1(CD54).
- 60
20. Un método como se definió en la afirmación 18 en donde dichas CPAAs tratadas con psoraleno/UVA comprenden células de *Drosophila* transfectadas con moléculas de HLA y moléculas coestimuladoras.
- 65
21. Un método como se definió en la afirmación 1 en donde dicha enfermedad, o condición médica e un cáncer seleccionado del grupo que consiste en melanoma maligno, mieloma múltiple, cáncer de próstata, linfoma, linfoma no-Hodgkin, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, linfoma de Burkitt, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, glioma, y cáncer de cerebro.
22. Las células presentadoras de antígeno artificial de las CPAAs inactivadas de (CPAAs de *Drosophila*) con ácido nucleico reticulado, en donde las CPAAs de *Drosophila* están inactivadas por un tratamiento de

derivado de psoraleno y expuestas a una dosis de fotoactivación de irradiación UVA, en donde las CPAAs inactivadas de *Drosophila* pueden activar a los linfocitos T cuando las CPAAs inactivadas se cargan con uno o más antígenos péptidos antes o concomitantes con la activación de linfocitos T.

- 5 **23.** Las CPAAs inactivadas de *Drosophila* como se definió en la afirmación 22 en donde dichas CPAAs de *Drosophila* expresan una molécula humana CMH clase I, β -2 microglobulina y una o más moléculas auxiliares que comprende una molécula co-estimuladora seleccionada del grupo que consiste en CD80 (B7-1), LFA-3 (CD58), CD83, CD86 (B7-2) o un miembro de la familia de TNF seleccionado de entre el grupo que consiste en CD70, o una adhesión molecular seleccionada del grupo que consiste en ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 y LFA-3.
- 10
- 24.** Las CPAAs inactivadas de *Drosophila* como se definió en la afirmación 23 en donde dicha HLA humana molécula CMH clase I es antígeno HLA-A2.1.
- 15
- 25.** Un método como se definió en la afirmación 23 en donde la molécula MCH clase 1 es HLA-A2.1 y las moléculas auxiliares son B7-1 (CD80), LFA-3(CD58), CD70 e ICAM-1.
- 26.** Las CPAAs inactivadas de *Drosophila* como se definió en la afirmación 22 en donde dichas CPAAs inactivadas de *Drosophila* son incapaces de proliferar y están esencialmente libres de contaminación.
- 20
- 27.** Las CPAAs inactivadas de *Drosophila* como se definió en la afirmación 22 en donde dicho derivado de psoraleno es es seleccionado del grupo que consiste en: 8-metoxipsoraleno (8-MOP), 4'-(aminomentil)-4,5', 8-psoraleno (AMT), o amotosalen (S59).
- 25
- 28.** Las CPAAs inactivadas de *Drosophila* como se definió en la afirmación 22 en donde dichas CPAAs de *Drosophila* son inactivadas mediante tratamiento de un derivado de psoraleno en una concentración de 1 a 100mg/ml y exponiéndolas a irradiación UVA con una dosis de 1 to 100 Julios/cm2 de irradiación UVA por un periodo de 1 a 60 minutos.
- 30
- 29.** Las CPAAs inactivadas de *Drosophila* como se definió en la afirmación 22 en donde uno o más antígenos de péptido son seleccionados del grupo que consisten en: melanoma asociados con el cáncer, antígenos peptídicos asociados con el cáncer de ovario, antígenos peptídicos asociados con el cáncer de mama, cáncer de pulmón, leucemia, mieloma múltiple, antígenos peptídicos asociados al linfoma y antígenos peptídicos asociados al cáncer de próstata.
- 35
- 30.** Las CPAAs inactivadas de *Drosophila* como se definió en la afirmación 22 en donde uno o más antígenos de péptido seleccionados del grupo que consisten en: SILSLKEAST (SEQ ID NO.1), KMASRSMRL (SEQ ID NO.2), ALALAALLVV (SEQ ID NO. 3), ALLVVDREV (SEQ ID NO. 4), YMNGTMSQV (SEQ ID NO.5), YMDGTMSQV (SEQ ID NO.6), ITDQVPFSV (SEQ ID NO.7), YLEPGPVTA (SEQ ID NO.8), AAGIGILTV (SEQ ID NO.9), ELAGIGILTV (SEQ ID NO.10), CLT- STVQLV (SEQ ID NO. 11), HLYQGCQVV (SEQ ID NO. 12), KIFGSLAFL (SEQ ID NO. 13), IISAVVIGIL (SEQ ID NO.14), PLTISIISAV (SEQ ID NO.15), VMAGVGSYV (SEQ ID NO.16), VLVKSPNHV (SEQ ID NO.17), ELVSEFSRM (SEQ ID NO.18), YLSGANLNL (SEQ ID NO.19), GPLTLPV (SEQ ID NO.20), SLLMWITQC (SEQ ID NO.21), KALFAGPPV (SEQ ID NO.22), YLETFREQV (SEQ ID NO.23), GLQSPKSPL (SEQ ID NO.24), VLLKLRRPV (SEQ ID NO.25), ELYIPVDL (SEQ ID NO.26), SLLMWITQV (SEQ ID NO.27), ILAKFLHWL (SEQ ID NO.28), STAPPVH- NV (SEQ ID NO.29), FLWGPRLV (SEQ ID NO.30), FMWGNLTLA (SEQ ID NO.31), RLVDDFLLV (SEQ ID NO.32), HLSTAFARV (SEQ ID NO.33), QLSLLMWIT (SEQ ID NO.34), ELWTHSYKV (SEQ ID NO.35), KVAELVHFL (SEQ ID NO.36), YIFATCLGL (SEQ ID NO.37), HLYIFATCL (SEQ ID NO.38), MLMAQEALAF (SEQ ID NO.39), STLE-KINKT (SEQ ID NO.40), KASEKIFYV (SEQ ID NO.41), SLLMWITQCFL (SEQ ID NO.42), ELTLGEFLKL (SEQ ID NO.43), LTLGEFLKL (SEQ ID NO.44), SLLEKREKT (SEQ ID NO.45), TLGEDDPWL (SEQ ID NO.46), KLGLKPLEV (SEQ ID NO.47), YLWTSKNT (SEQ ID NO.48), STAPPAHGV (SEQ ID NO.49), GMGSEELRL (SEQ ID NO.50), SLGSPVLGL (SEQ ID NO.51), YLFFYRKS (SEQ ID NO.52), CQQEETFLL (SEQ ID NO.53), TLAKFSPYL (SEQ ID NO.54), NLTHVLPV (SEQ ID NO.55), STFKNWPFL (SEQ ID NO.56), SLLQHILGL (SEQ ID NO.57), FLDQRVFFV (SEQ ID NO.58), FLDQRVFFV (SEQ ID NO.59), FLDQVAFVV (SEQ ID NO.60), GLDREQLYL (SEQ ID NO.61), VMQHLLSPL (SEQ ID NO.62), QQTHGITRL (SEQ ID NO.63), LQPLSGPGL (SEQ ID NO.64), TLDRL- SLYV (SEQ ID NO.65), QLYLELSQL (SEQ ID NO.66), KVLEYVIKV (SEQ ID NO.67), KVADLVGFL (SEQ ID NO.68), KTWGQYWQV (SEQ ID NO.70 y VLDGLDVLL (SEQ ID NO.71)
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

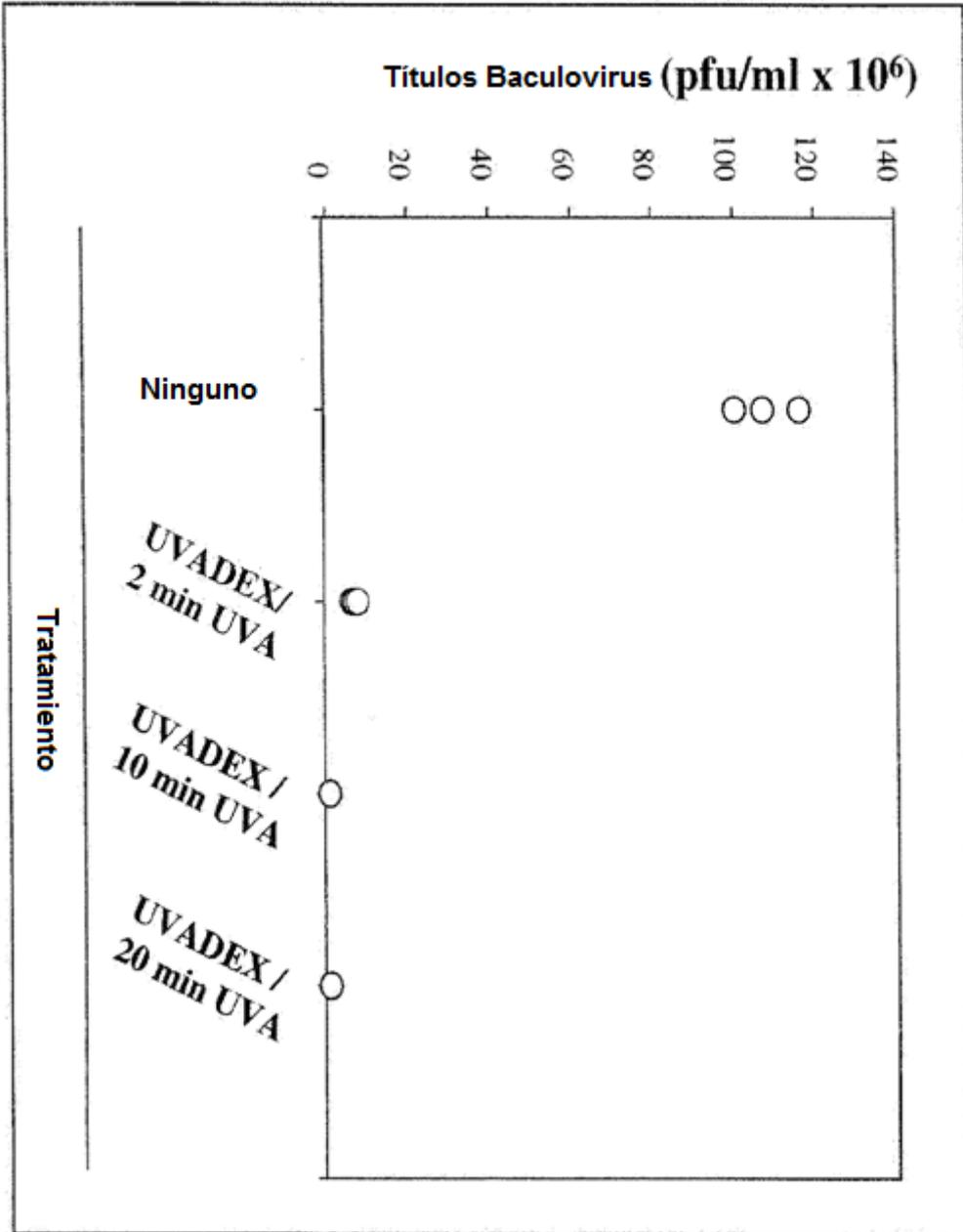


Figura 1

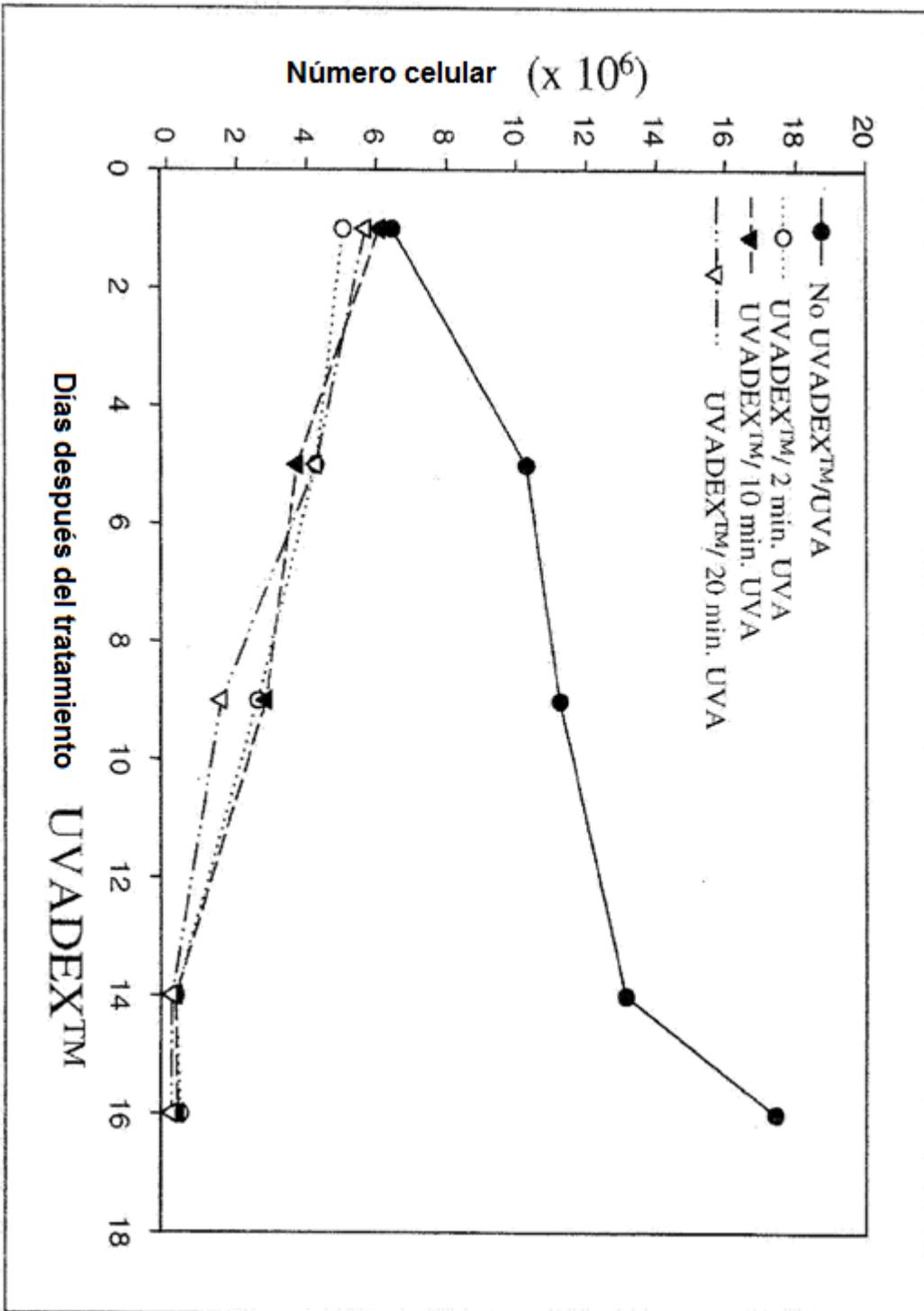


Figura 2

Figura 3

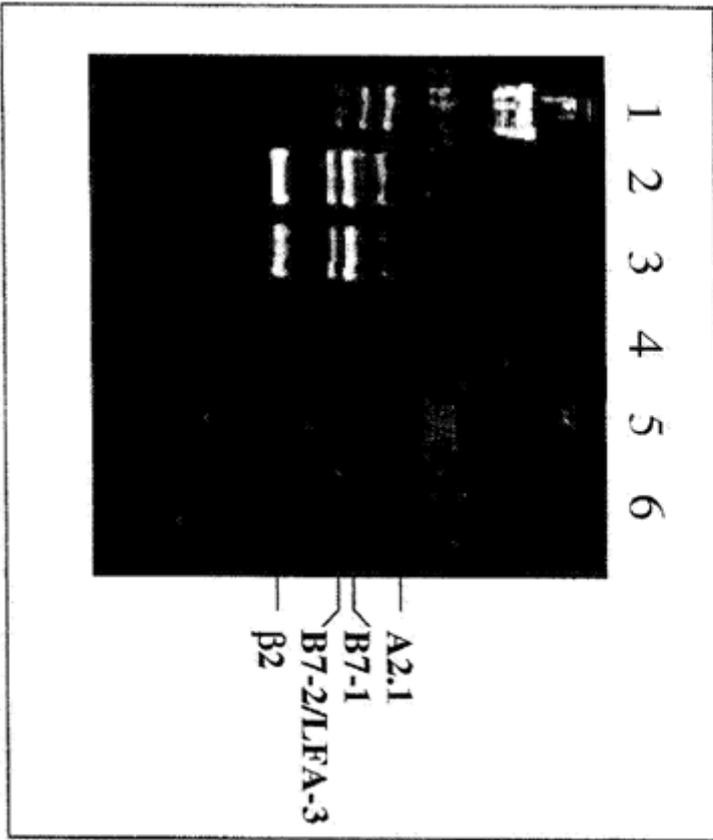


Figura 4A

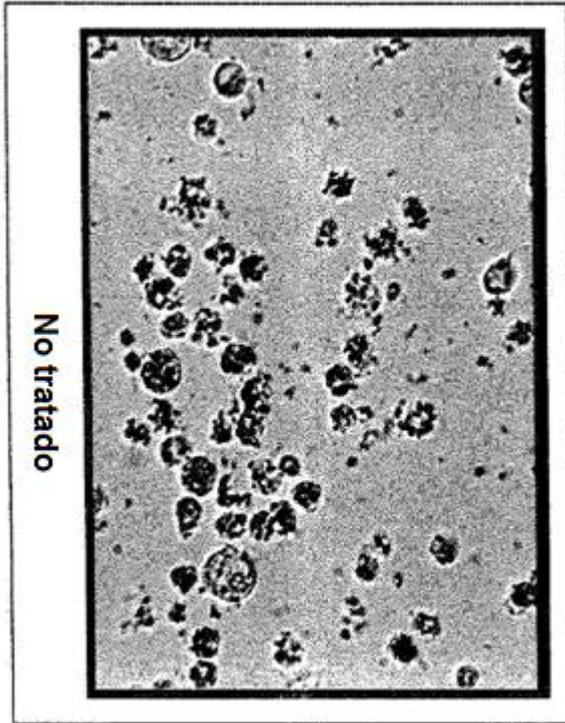
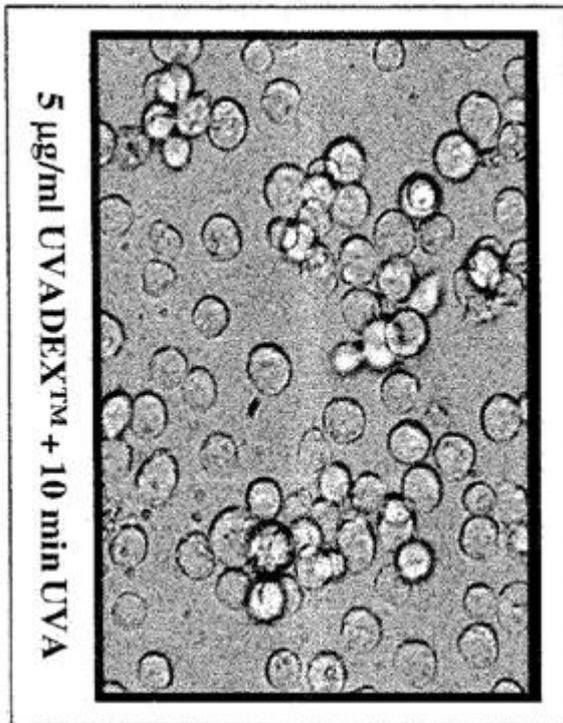


Figura 4B



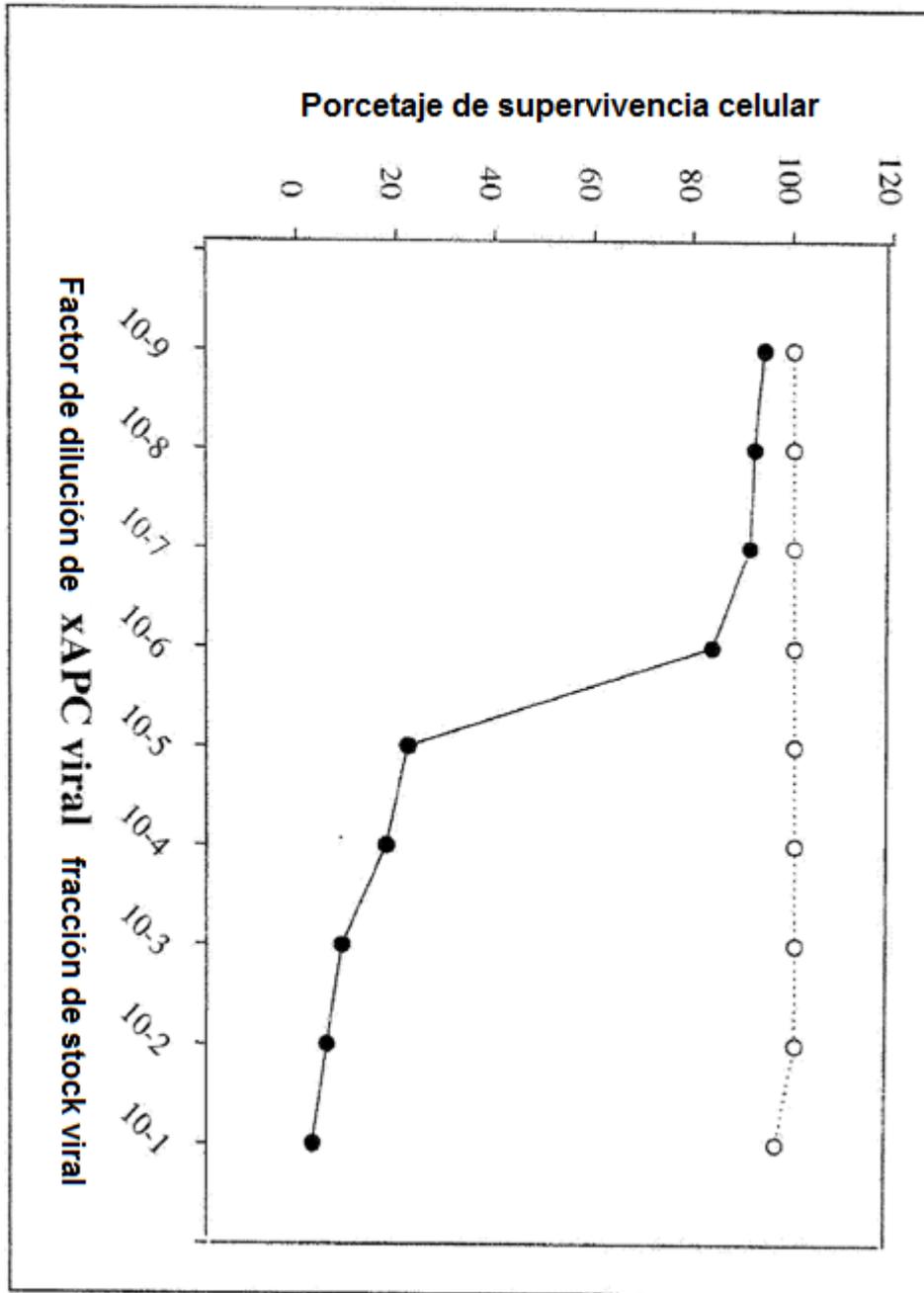


Figura 4C

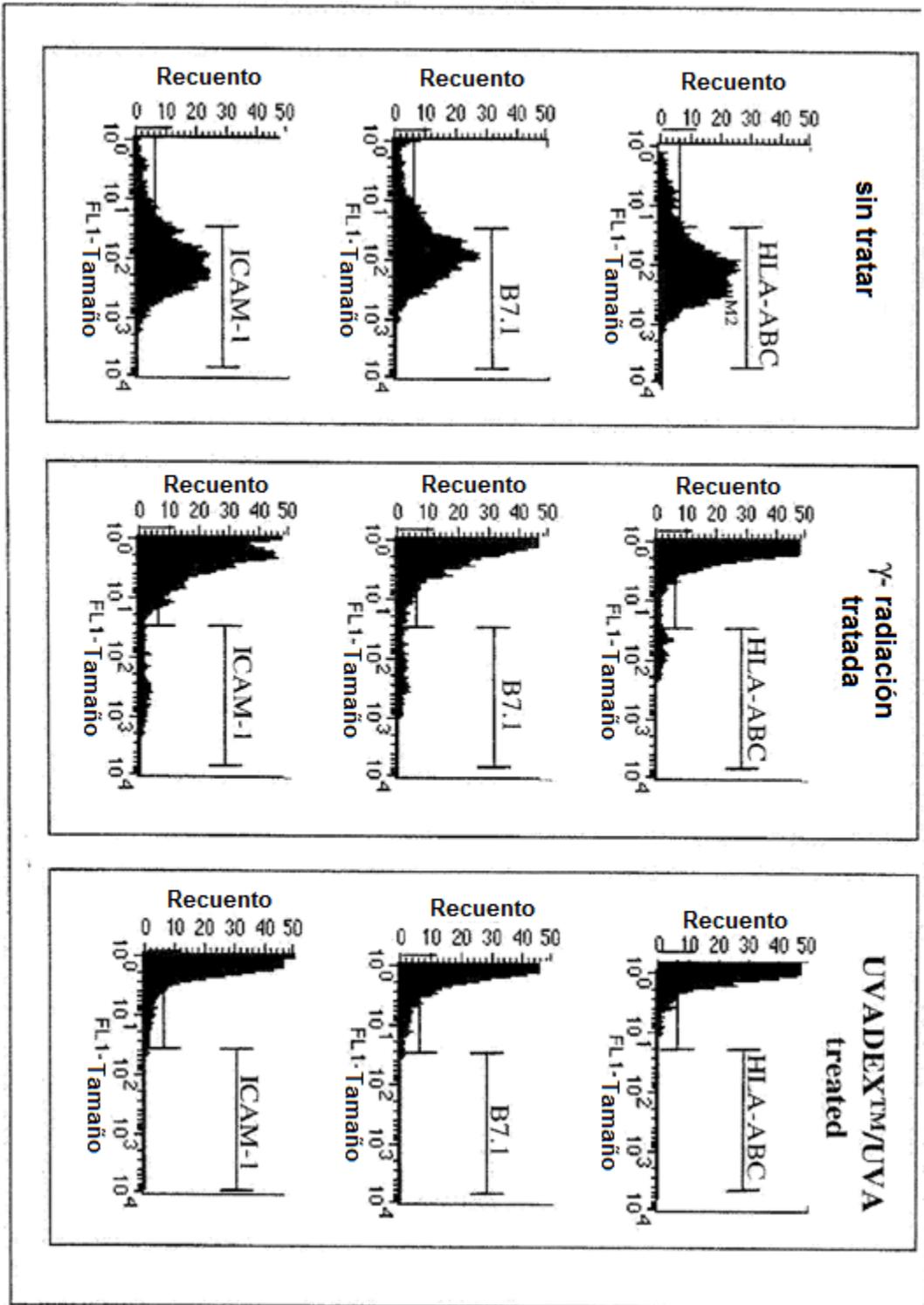


Figura 5

Figure 6

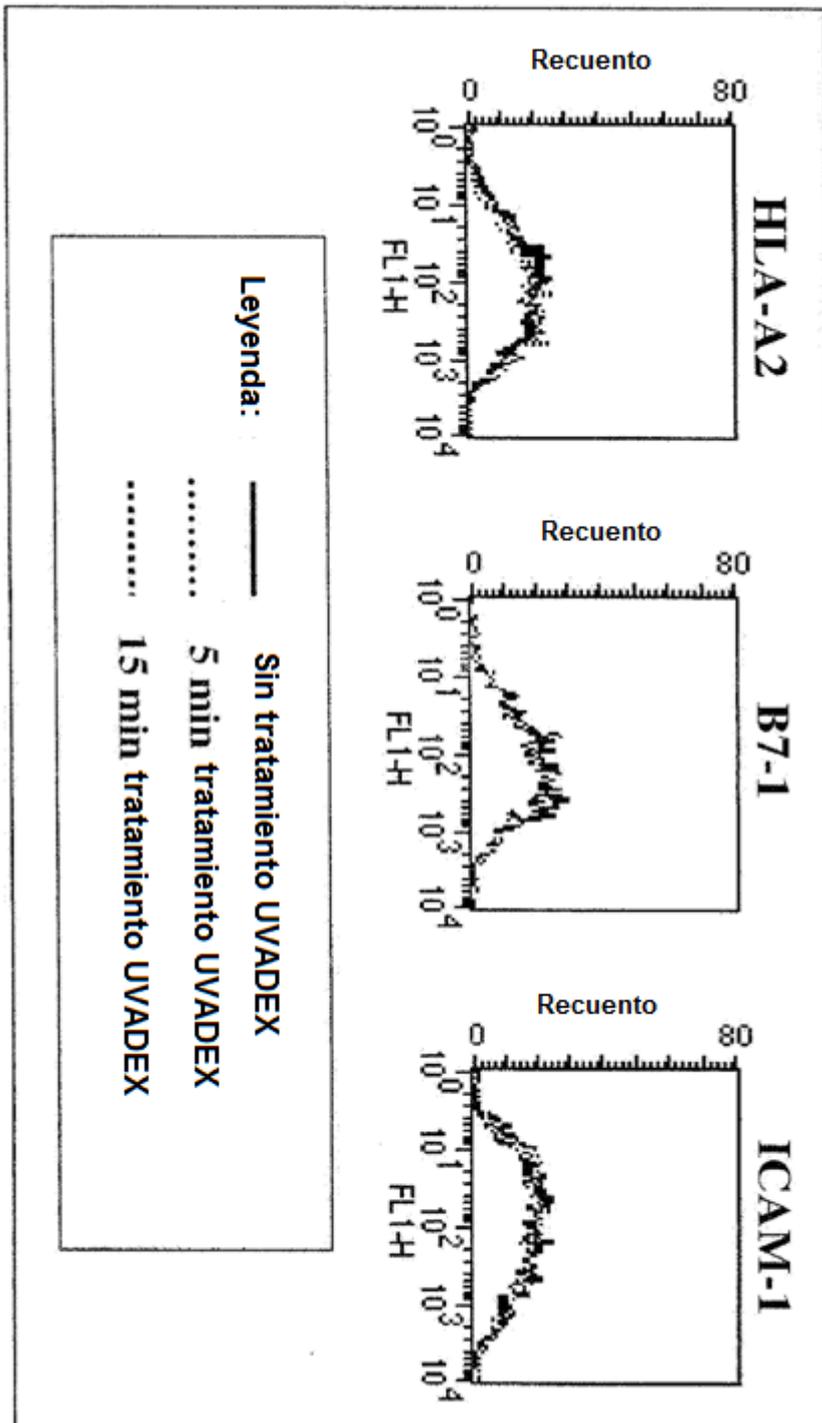


Figura 7

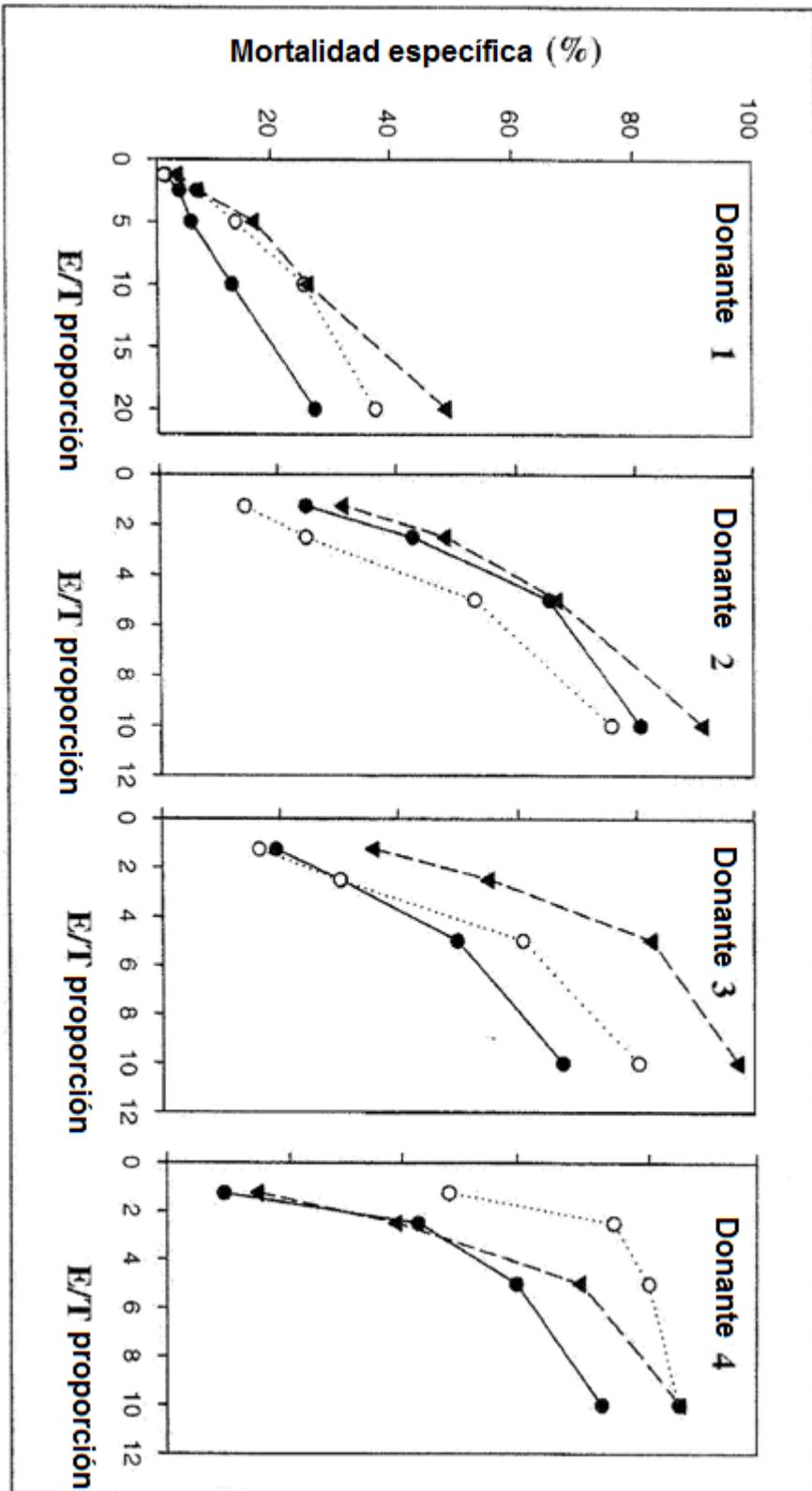


Figura 8A

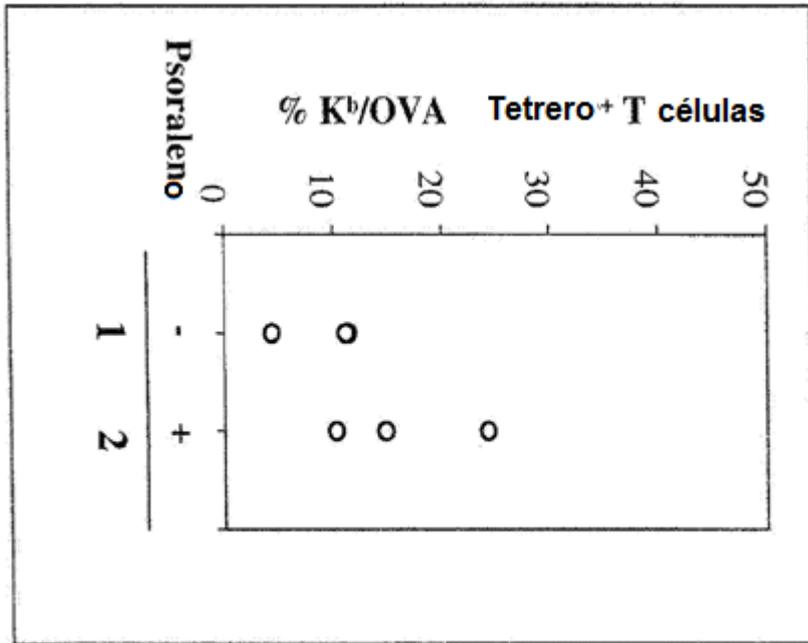


Figura 8B

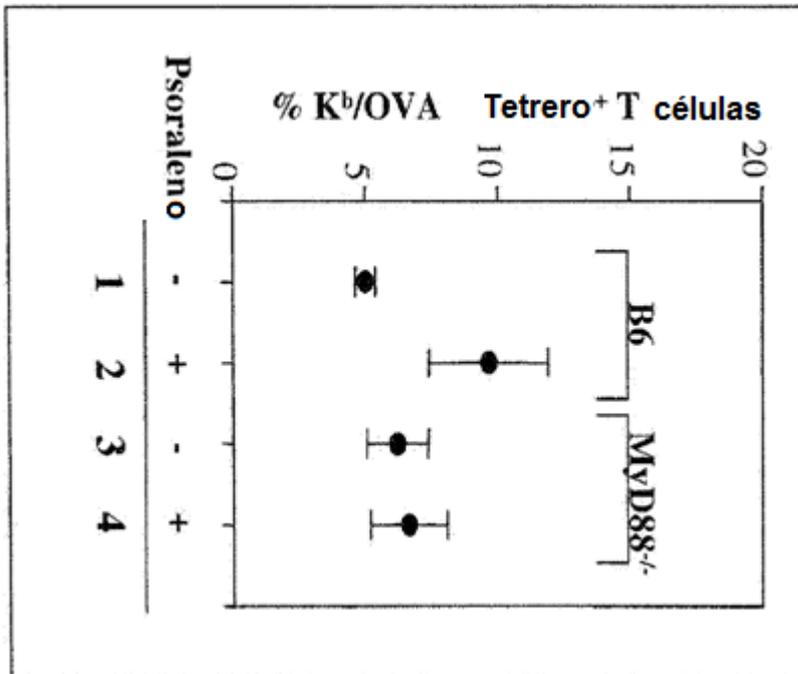


Figura 9A

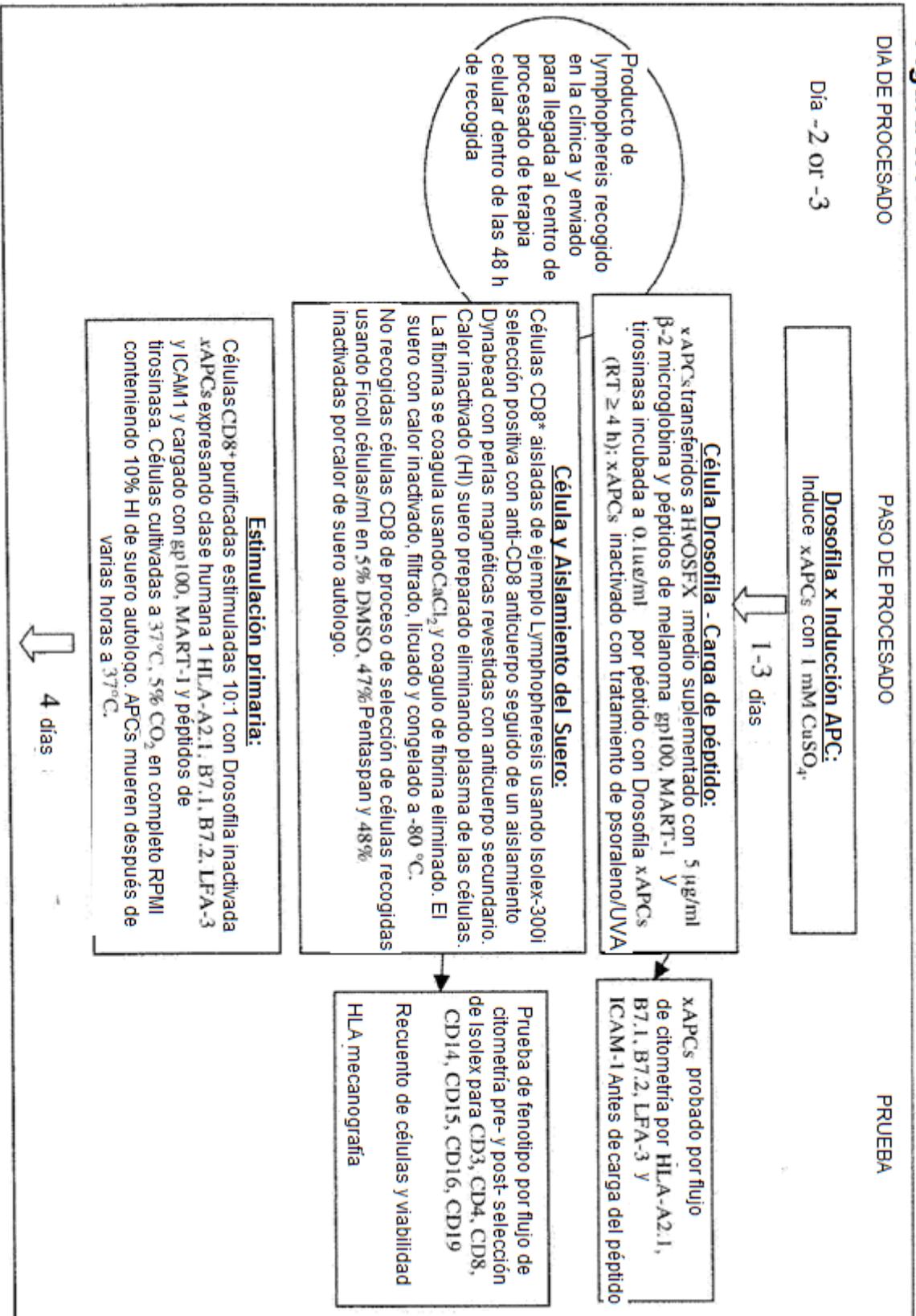


Figura 9B

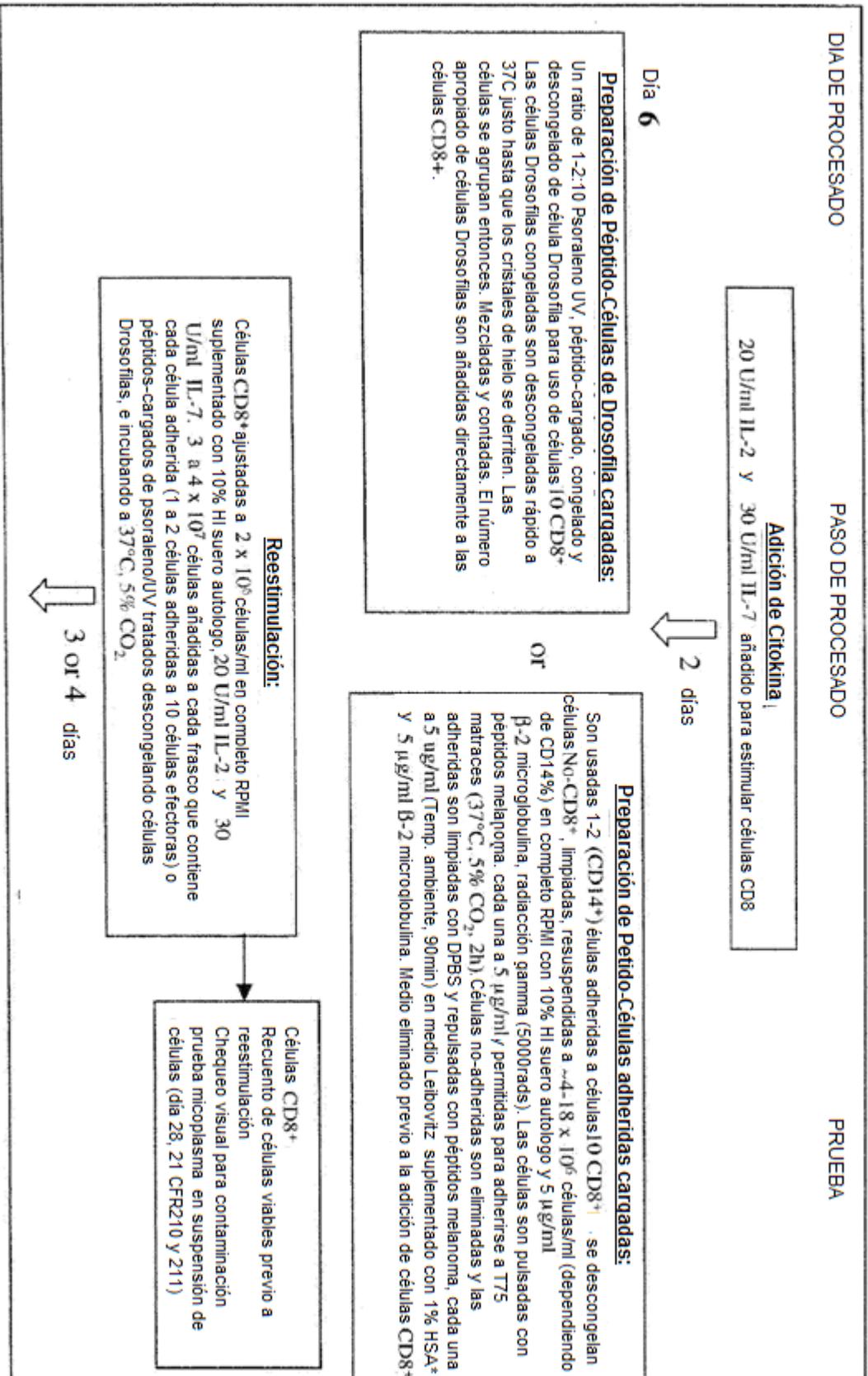


Figura 9R

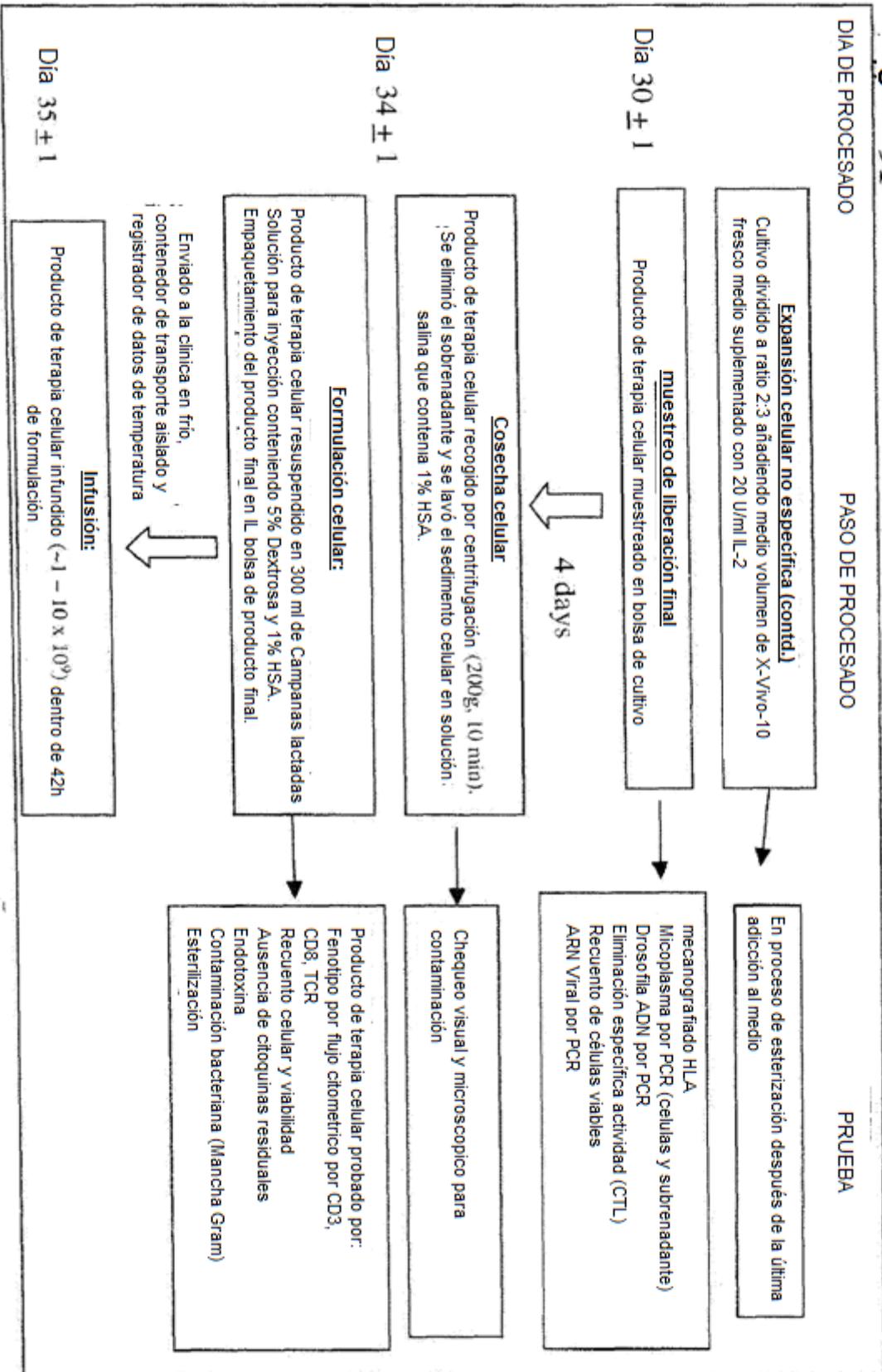


Figura 10

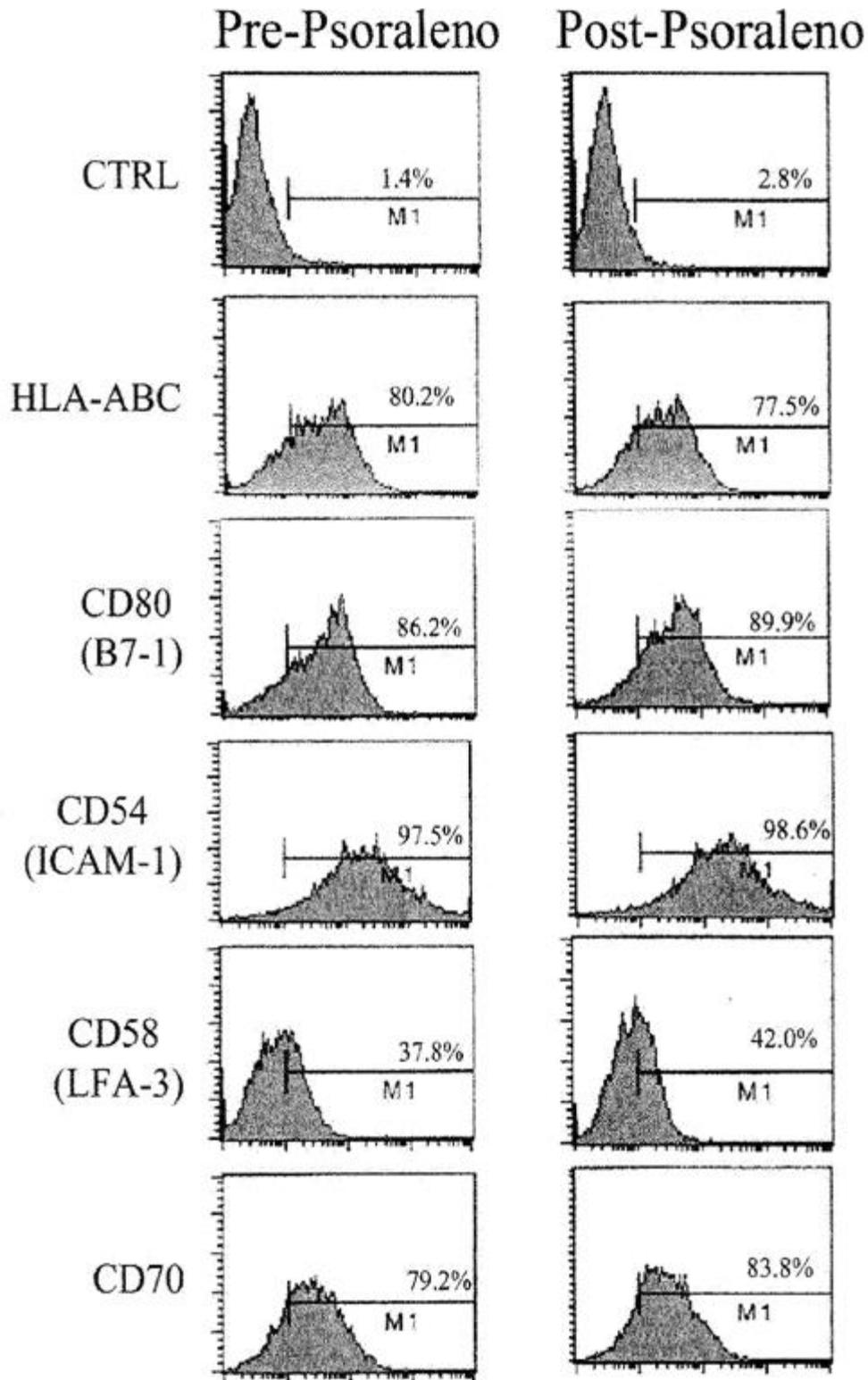


Figura 11 A

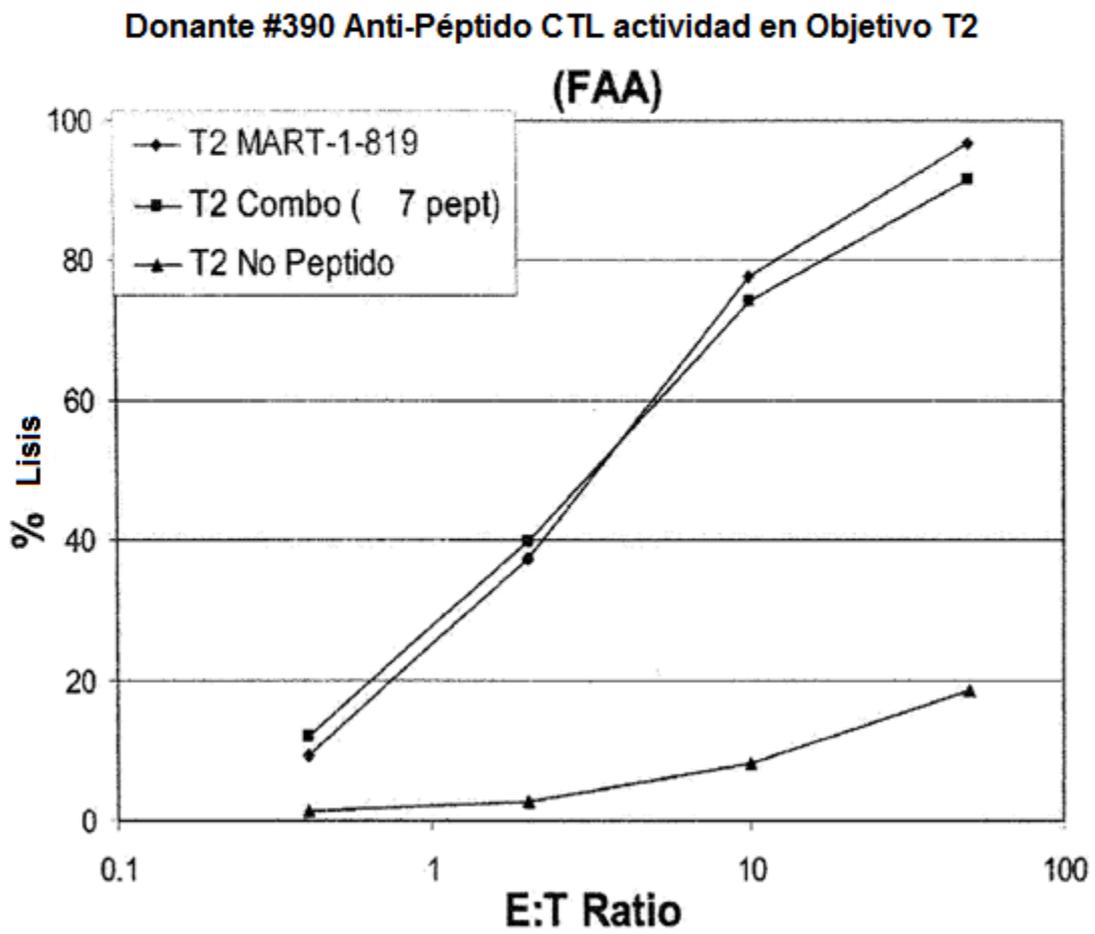


Figura 11 B

Donante #390 Anti-Tumor CTL actividad en Objetivo M14 (FAA)

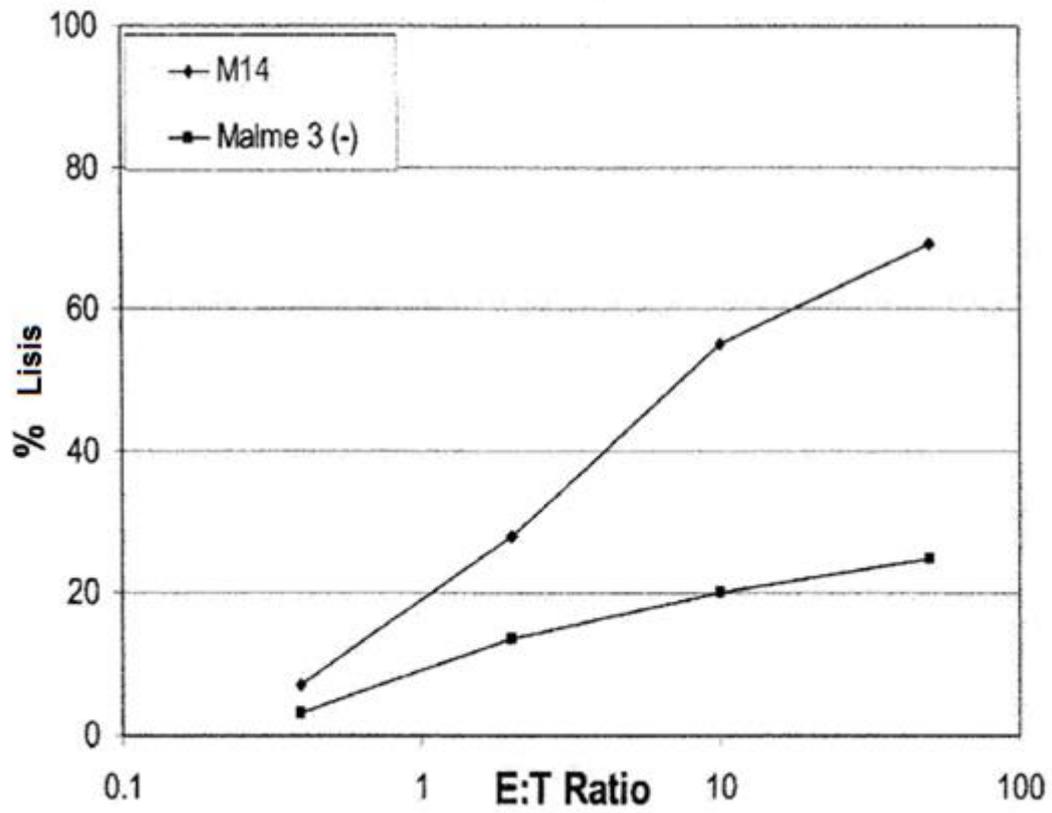


Figure 11 C

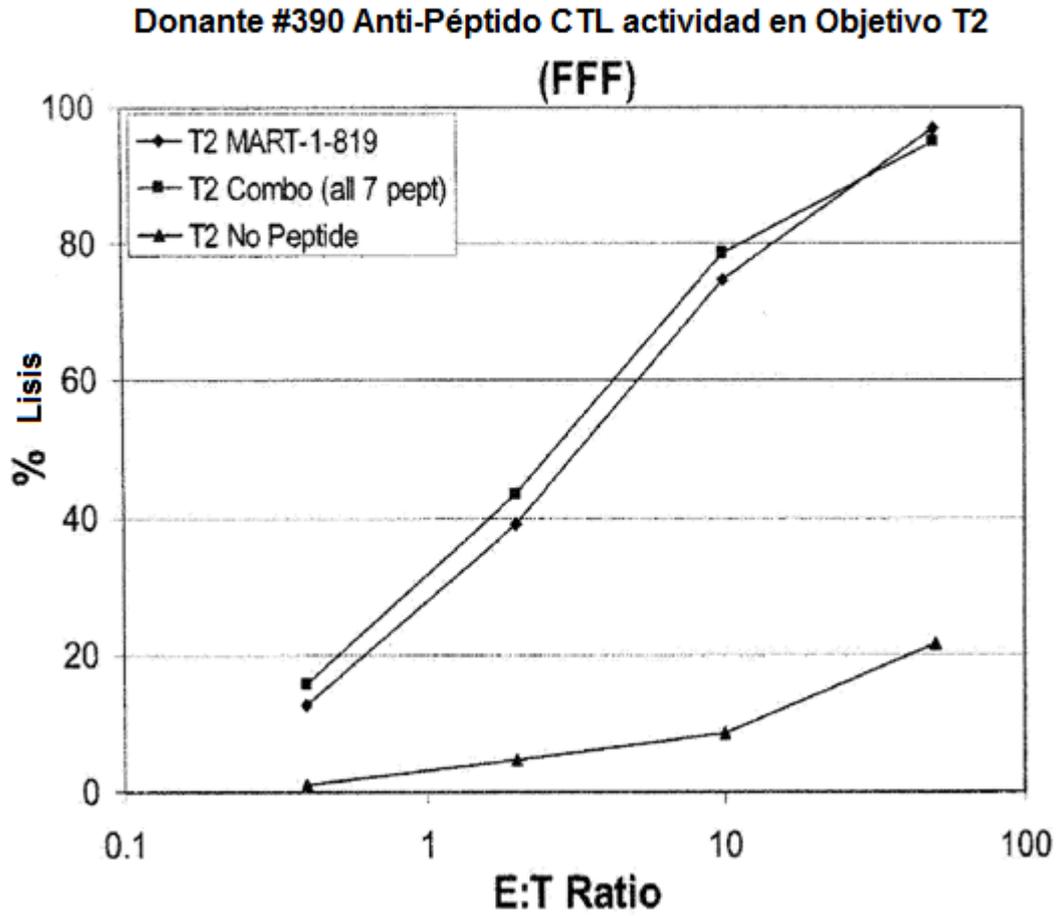


Figure 11 D

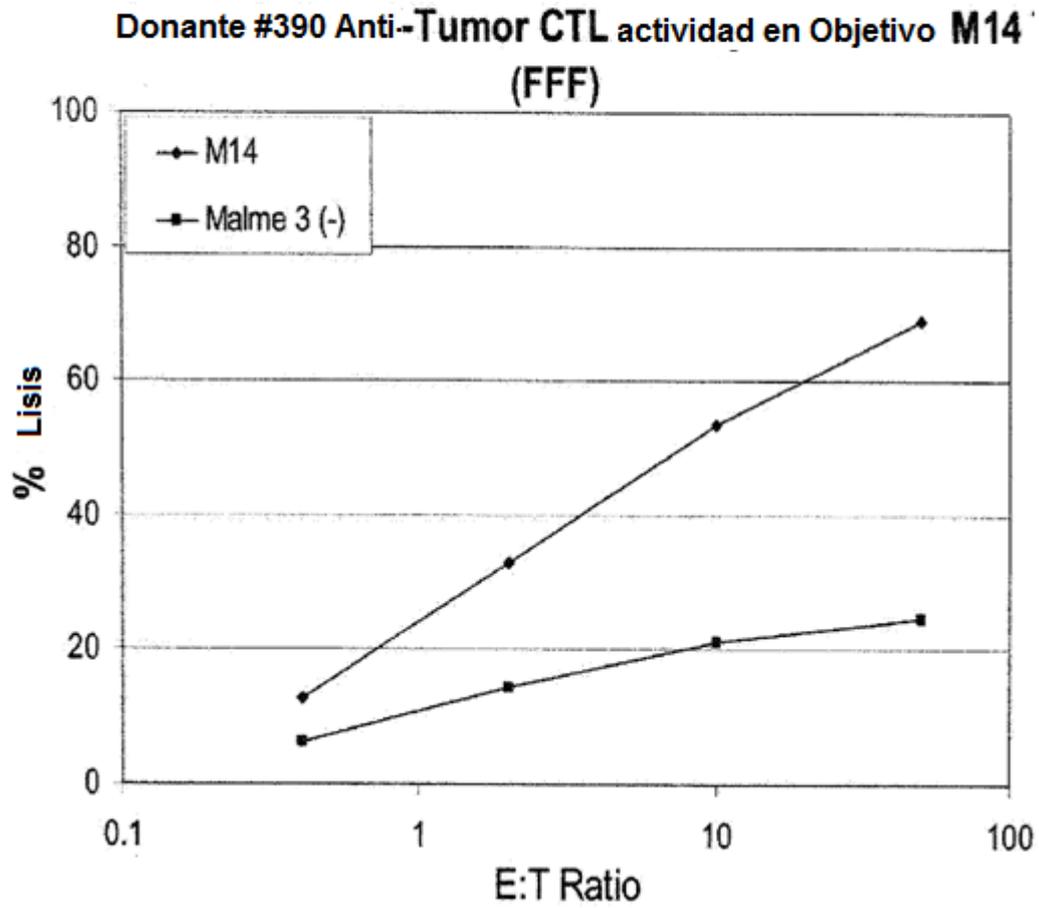


Figura 12

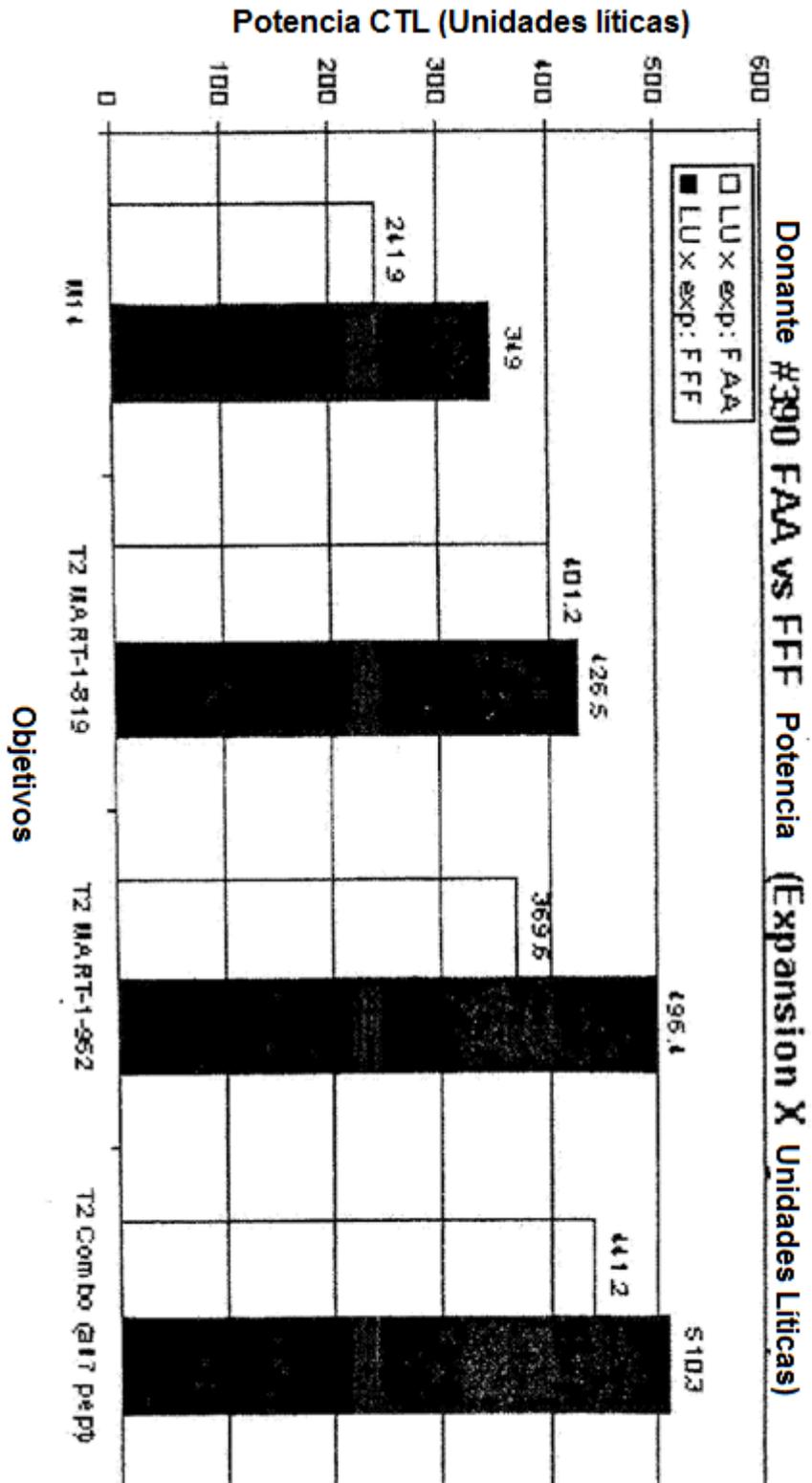


Figura 13

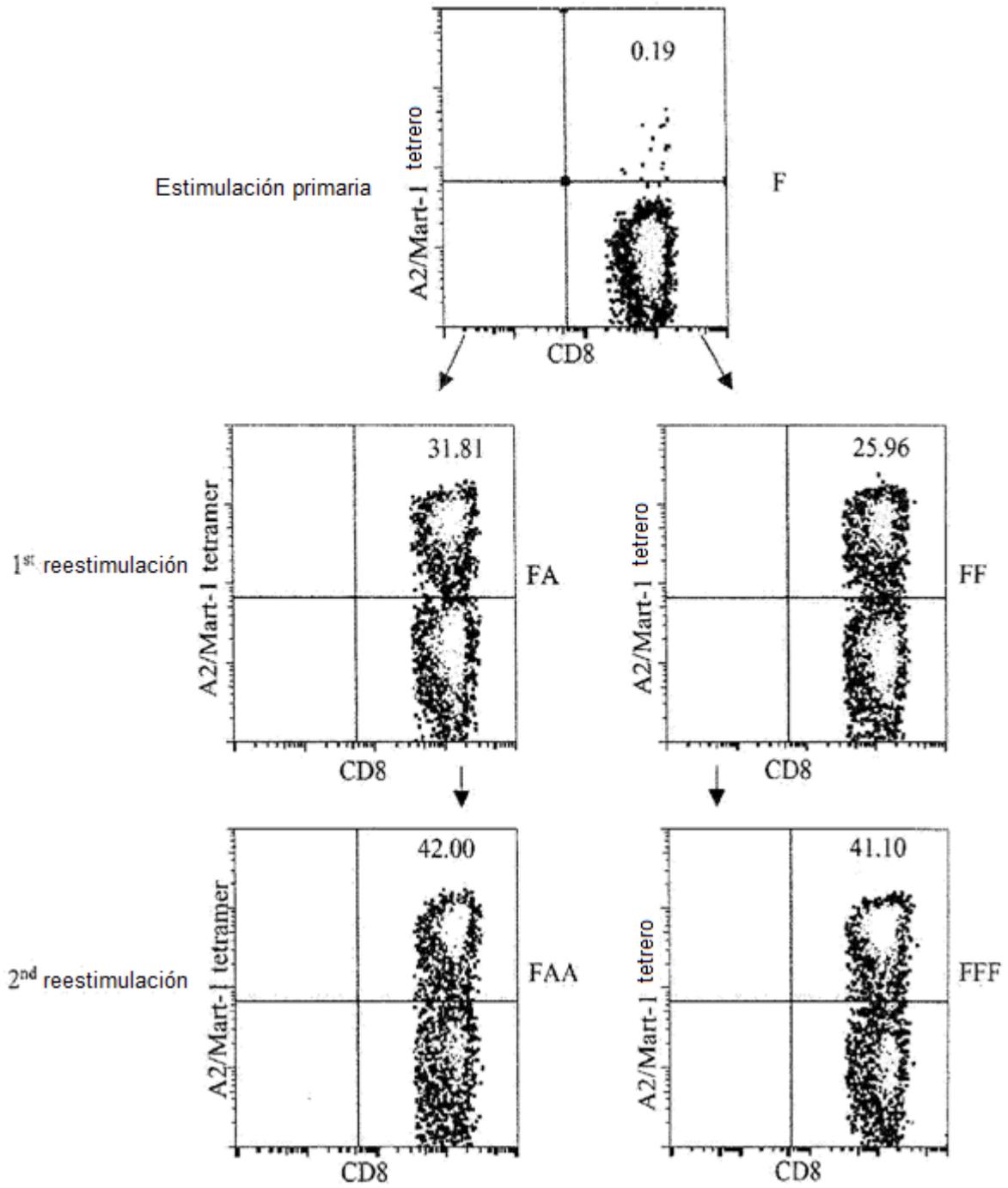


Figura 14

