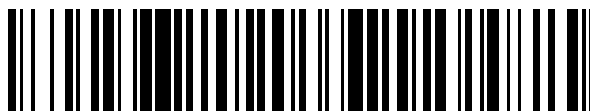


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 406**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2007 PCT/IB2007/000954**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2007 WO07116309**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2007 E 07734273 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2016407**

54 Título: **Aplicación diagnóstica y terapéutica de linfocitos CTL y NK seleccionados de forma funcional**

30 Prioridad:

12.04.2006 IT BO20060267

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

21.06.2017

73 Titular/es:

**MENARINI SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)
Via G. di Vittorio 21 B/3
Castel Maggiore (BO), IT**

72 Inventor/es:

**GAMBARI, ROBERTO y
GUERRIERI, ROBERTO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 618 406 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aplicación diagnóstica y terapéutica de linfocitos CTL y NK seleccionados de forma funcional

Campo de la invención

- La invención propone una metodología terapéutica y diagnóstica nueva a base del uso de células efectoras (por ejemplo linfocitos CTL y NK) seleccionadas por tener la capacidad de inducir la lisis en células diana. En particular, la invención enseña como seleccionar cepas de células efectoras del sistema inmunitario a base de sus propiedades líticas. También enseña cómo pueden mejorarse los procedimientos diagnósticos para comprobar la actividad de vacunas terapéuticas, considerando lo que se muestra. Para finalizar, muestra cómo pueden mejorarse las terapias celulares utilizadas actualmente mediante el uso de esta estrategia.
- Debe indicarse que aquí y más adelante, por las expresiones "célula(s) efectora(s)" o, de forma más general, por los términos "efectora/efectoras" se entiende una partícula (una célula o un microorganismo genérico) que tiene un efecto sobre una partícula "diana", a su vez definida como una célula o microorganismo genérico en el cual se expresa la modificación inducida por el efector.

Estado de la técnica

- Algunas propiedades de funcionamiento importantes del sistema inmunitario están determinadas por la acción de grupos celulares considerados como "raros". En este contexto, por "raro" se entiende una subpoblación de células que tiene una frecuencia de una parte por mil o menos dentro de una subpoblación conocida. Se sabe, por ejemplo, que la evolución de enfermedades tales como las oncológicas puede confrontarse por un subgrupo de células del sistema inmunitario que tienen la propiedad de inducir la lisis en células diana que tengan las características oportunas. Es igualmente conocido que tales células efectoras son raras, por lo que esta acción no es muy eficaz si no se estimula mediante los medios terapéuticos oportunos.

- En el campo terapéutico, los linfocitos CTL y NK se aíslan ahora a través de una prepurificación, combinada con una selección clonal mediante dilución "al límite" (10). Estas estrategias, aunque son válidas y han sido exitosas en su aplicación, son complejas, largas y caras. Además, la estrategia de la selección clonal no siempre puede activarse, dado que en muchos casos se desconocen o se conocen solo en parte las características de los receptores de las células diana (por ejemplo que pertenecen a un tumor) a atacar.

A este respecto,

1. se sabe que en los casos en los cuales se conocen los péptidos específicos de tumor, es posible la preselección de poblaciones de los CTL específicos de tumor y ya se descritos en protocolos terapéuticos (11);
2. se sabe que en la mayoría de los casos, los CTL específicos de células neoplásicas están presentes en el paciente en el orden de 1/1000-10.000 (12);
3. es posible aislar, con técnicas inmunológicas, poblaciones de CTL dentro de la cual pueden identificarse los CTL específicos de tumor (13);
4. pueden expandirse *in vitro* los CTL individuales para dar lugar a poblaciones homogéneas que se pueden utilizar para el seguimiento de análisis bioquímicos (14) y, si se expanden de manera suficiente, para la inmunoterapia de tumores, y deberían mantenerse específicas para las células malignas (15);
5. pueden aplicarse estrategias completamente similares a las de aislamiento de CTL a otras células efectoras que tengan la capacidad de inducir la lisis en células diana;
6. el uso de los CTL (y de las células efectoras análogas) en la inmunoterapia no se restringe al tratamiento de tumores sino que puede incumbir a otras patologías, entre ellas patologías víricas (por ejemplo SIDA) y patologías debidas a una infección bacteriana.

Las consideraciones llevadas a cabo para los CTL también se extienden a los linfocitos NK, sobre todo en cuando se logre el uso de los mismos, si son particularmente activos en inducir la lisis en las células tumorales (16).

- Altomare L. *et al.* (2003) divulga un dispositivo de placa de circuito impreso que tiene la capacidad de generar jaulas a base de dielectroforesis controladas por programa informático que permiten mover células tumorales "atrapadas" en las jaulas.

Fuchs AB. *et al.* (2006) divulga un chip microelectrónico que integra una serie de electrodos y detectores que permiten la manipulación individual y paralela de células individuales de muestras de células mientras se mantiene la viabilidad y la proliferación.

5 Rickinson AB. (1995) divulga la recogida de las CTL de pacientes y la reinfusión en el paciente tras la reactivación *in vitro*.

Schoell WMJ. *et al.* (1999) divulga un método para la generación *in vitro* de linfocitos T citotóxicos (los CTL) específicos para el péptido E7 del HPV-16 a partir de los CMSP de sujetos sanos para la futura inmunoterapia adoptiva del cáncer de cuello uterino.

10 A la luz de estas consideraciones, es de gran importancia en el ámbito terapéutico un método que permita seleccionar clones de CTL elevadamente líticos con respecto a las células diana en un tiempo razonable y de un modo eficaz.

Sumario de la invención

15 La presente invención enseña un método para la selección funcional de células del sistema inmunitario por medio del control en tiempo real y la cuantificación de la lisis de células diana (por ejemplo células tumorales) mediada por linfocitos T citotóxicos (CTL) (1) y de otras células que tengan la capacidad de inducir lisis en dianas celulares oportunas (normalmente linfocitos citolíticos naturales NK) (2). Tales métodos son a base del ensayo analítico innovador para la actividad de los CTL y otras células líticas con capacidades más altas que los disponibles en la actualidad. Por lo tanto, la presente invención tiene aplicaciones inmediatas en el sector diagnóstico. Además, tal método se propone para una estrategia eficaz para el aislamiento de clones de células efectoras (normalmente los CTL o los NK) que tengan alta actividad. Por lo tanto, la presente invención tiene importantes aplicaciones en el sector terapéutico.

25 En particular, la invención se refiere a un método para la selección de células del sistema inmunitario recogidas anteriormente de un ser humano, útiles en particular para la obtención de información importante para la comprobación diagnóstica/pronóstica de la patología de un paciente neoplásico, que incluyen las etapas de: a) permitir que las células del sistema inmunitario recogidas anteriormente interactúen con las partículas diana respectivas, cuya modificación, debido a dicha interacción, es un índice de una propiedad deseada de las células del sistema inmunitario; b) comprobar el efecto de la interacción sobre las partículas diana y c) seleccionar, entre las células del sistema inmunitario que se han sometido a la interacción con las partículas diana, aquellas que hayan inducido la modificación en las partículas diana, que actúan, por lo tanto, contra las mismas, como células efectoras.

30 Además, el método de acuerdo con la invención también puede incluir la etapa de expansión de células del sistema inmunitario que se han seleccionado al final de la etapa c) para crear clones de efectores antitumorales seleccionados aguas arriba por una eficacia particular del mecanismo lítico, a partir de poblaciones heterogéneas (circulantes o "fijas" en las áreas linfáticas de drenaje) de células mononucleares.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, la etapa de expansión se realiza mediante fases sucesivas, llevando a cabo entre una fase y la siguiente una reelección de efectores con características óptimas durante la amplificación *ex vivo* de poblaciones clonales posiblemente inestables, en particular repitiendo las etapas a), b) y c) sobre al menos una de dichas poblaciones clonales posiblemente inestables.

40 La invención se refiere adicionalmente al uso del método anterior para la preparación de un fármaco que incluye células del sistema inmunitario que se han seleccionado a través de las etapas a), b) y c), y/o sus clones, en un vehículo adecuado para una reinfusión *in vivo* con fines terapéuticos, posiblemente tras la estimulación con células dendríticas.

45 Para finalizar, la invención se refiere al uso de un dispositivo miniaturizado que permite la manipulación de células efectoras y de células diana sin modificar la actividad biológica de las mismas, para llevar a cabo la selección de células efectoras y para la preparación de un fármaco del tipo indicado anteriormente, así como al uso de células efectoras líticas seleccionadas y expandidas para la preparación de un fármaco para el tratamiento de patologías que pueden tratarse mediante una reinfusión *in vivo* de las células efectoras líticas seleccionadas y expandidas, caracterizado porque el fármaco solo incluye células efectoras seleccionadas anteriormente y/o clones de células efectoras seleccionados anteriormente, que tienen todos una actividad lítica sustancialmente comparable.

Breve descripción de las figuras

50 Figura 1.A: desplazamiento de los CTL (3 CTL: CTL1, CTL2, CTL3, indicados por flechas) dirigido a afectar a células tumorales diana (indicadas mediante una flecha a la izquierda).

B: complejo de los CTL y la célula diana.

Figura 2. Interacción de los CTL (flechas negras) y de una célula diana (flecha blanca): la célula diana está en un estado de lisis avanzado.

Figura 3.A: cinética de lisis de las células diana. B: CTL no preactivados.

5 Figura 4.A: efecto de la calceína sobre la actividad lítica de los CTL, medida a través del % de lisis en un ensayo de liberación de Cr51. En los gráficos de barras negras se informa la lisis específica de las LCL diana (B35, cargadas con péptido de EBV), en presencia (a la izquierda) o en ausencia (a la derecha) de calceína; en los gráficos de barras blancas se informa sobre el control representado por las LCL no cargadas con el péptido.

10 B. efecto del tampón de manitol sobre la actividad lítica de los CTL (ensayo de liberación de Cr51). En los gráficos de barras negras se informa sobre la lisis específica de las LCL diana, en un tampón que contiene manitol (a la izquierda) o en un tampón convencional (RPMI; a la derecha); en los gráficos de barras blancas se muestra el control representado por las LCL no cargadas con péptido.

15 Figura 5. Detección de la lisis específica de las LCL diana cargadas con el péptido de EBV en un tampón de manitol, tras el desplazamiento de DEP (dielectroforesis) y la carga con calceína, en SmartSlide®. Paneles A-D: la lisis de las LCL positivas para HPV por los CTL específicos para HPV se ha detectado tras 10' y 20'; paneles E-H: por el contrario, los CTL específicos para EBV no lisan las LCL no cargadas con el péptido.

20 Figura 6. Los datos informados son la media de tres experimentos en los que se detecta la disminución de la señal de fluorescencia (calceína) a lo largo del tiempo, debido a la lisis de LCL-B35 cargadas con péptido de EBV por los CTL específicos, tras la coincubación en un tampón convencional (RPMI) durante 15' (panel B) o 30' (panel C). Una detección de control paralela (gráficos de barras blancas en A; símbolos vacíos en C) muestra que la lisis es específica; de hecho, está ausente si las LCL no están cargadas con el péptido de EBV; la disminución de la intensidad de la señal a lo largo del tiempo es, en este caso, mínima.

Descripción detallada

25 Para el análisis de la actividad de los CTL, el método más utilizado actualmente es a base de la liberación de Cr51 a partir de células lisadas (3). Se han ajustado recientemente otros métodos, a base de la liberación de europio no radioactivo (Eu3+) (4), la liberación de marcadores fluorescentes (por ejemplo calceína) (5), el análisis de la actividad esterásica, el uso de anexina V o de beta-galactosidasa. Además, Acea Biosciences comercializa otros métodos a base de análisis electrónico de la impedancia, el cual permite una comprobación en tiempo real de los efectos líticos inducidos sobre agregados celulares.

30 Estas metodologías tienen algunas desventajas importantes. En algunos casos, son a base del uso de moléculas radiactivas (3) y siempre determinan resultados "promedio" y no a nivel de células individuales (4, 5). Cuando se puede utilizar análisis de FACS (separación de células activadas por fluorescencia) (8), este requiere una cantidad significativo de células e instrumentos complejos y caros. En ninguno de estos análisis puede ser eficaz una evaluación en tiempo real.

35 A la vista de estas consideraciones, un método que permita controlar en tiempo real y de un modo eficaz la citólisis mediada por células efectoras (por ejemplo los CTL), extendiendo tal análisis a un nivel de célula individual o de clones elevadamente líticos contra células diana, es ciertamente de gran importancia en el ámbito diagnóstico y terapéutico.

A este respecto,

40 1. Se sabe que los CTL se dirigen a células que pueden someterse a tinción utilizando distintos colorantes supravitales, algunos de los cuales pueden liberarse fuera de las células si estas se lisan y/o están dañadas (la calceína (5) pertenece a estos colorantes supravitales);

45 2. Se sabe que los CTL se dirigen a células que pueden someterse a tinción utilizando distintos colorantes supravitales que identifican estructuras complejas (mitocondria, núcleo, etc.) y que no pueden liberarse fuera de las células, incluso si están dañadas (9) ;

3. Pueden utilizarse programas de procesamiento de datos y protocolos de formación de imágenes oportunos con el fin de cuantificar de un modo automatizado el porcentaje de células que manifiestan determinadas características.

Con respecto a la manipulación de células en tiempo real, la tecnología ha proporcionado recientemente algunas

tecnologías. Por ejemplo, las pinzas láser permiten crear jaulas ópticas que pueden contener células y, moviendo las jaulas, poner en contacto las células entre sí (17). Además, se sabe que los dispositivos del tipo "laboratorio en un chip" a base de dielectroforesis (DEP) pueden ser muy útiles para el desplazamiento de artículos biológicos de un modo programado (18-21). En particular, los dispositivos que consisten en una matriz de electrodos pueden tener la capacidad de manipular células individuales o agrupaciones de células individuales.

Un ejemplo de "laboratorio en un chip" a base de una matriz de electrodos se muestra en (21). En la base de la presente invención está el uso de metodologías en tiempo real para la manipulación de los CTL, NK y células neoplásicas diana, y que también tienen la capacidad de desplazar células individuales, con el fin de desarrollar un método eficaz en primer lugar para la identificación y después para el aislamiento de los CTL elevadamente citotóxicos y, por lo tanto, que se puedan utilizar en el tratamiento de patologías neoplásicas a través de estrategias inmunoterapéuticas.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Se obtuvieron líneas celulares linfoblastoides (LCL) tras la infección de linfocitos B humanos con la cepa B95.8 del virus Epstein-Barr (EBV) (26). Se utilizó para la estimulación el péptido específico de EBV HPVGEADYFEY (HPV), que corresponde con los aa 407-417 de la proteína EBNA1. Se sembraron en placa linfocitos procedentes de sangre periférica (PBL) procedentes de un donante con HLA-B35, a una concentración de $3,5 \times 10^6$ células por pocillo en placas de 24 pocillos en medio de cultivo RPMI 1640, SFT al 10% (Hyclone), y se estimularon con el péptido HPV (10 μ M). Tras 7 y 14 días los cultivos se estimularon nuevamente y el medio se complementó con rIL-2 10 U/ml (Chiron). En los días 14 y 21 se analizó la actividad CTL de los cultivos de linfocitos T utilizando los ensayos de citotoxicidad apropiados (liberación de ^{51}Cr) (3).

OBSERVACIONES SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los resultados de tal estudio se muestran en los ejemplos informados en las Fig. 1-6. Los ejemplos se proporcionan a fines de ilustración y no se pretende que limiten el ámbito de la invención de ningún modo. En la Fig. 1 se informa el desplazamiento de tres CTL (CTL1, CTL2, CTL3, indicado por flechas), dirigidos a afectar una única célula tumoral diana, generando los complejos mostrados en el lado derecho de la figura, en los que los CTL aparecen indicados mediante CTL1, CTL2, CTL3 y flechas, y las células diana se indica a la izquierda mediante una flecha.

Los inventores han encontrado, de forma sorprendente, que los CTL desplazados en un "laboratorio sobre un chip" que contiene una matriz de electrodos, se pueden poner en contacto con células diana neoplásicas y tienen la capacidad de lisarlas en un tiempo muy rápido (que varía de 8 a 20 minutos). Si las células se marcan con calceína, son fluorescentes si están intactas, perdiendo la fluorescencia si se dañan mediante los CTL (Fig. 2 y Fig. 3). Llevando a cabo tinciones dobles utilizando colorantes para mitocondrias o ADN, las células dañadas mediante los CTL pierden su fluorescencia de calceína manteniendo la de los colorantes específicos para mitocondria o ADN. Por lo tanto, a través de un análisis por microscopio fluorescencia (utilizando posiblemente programas de formación de imágenes), es posible discriminar los CTL activos de los CTL inactivos. Los CTL no seleccionados no muestran actividad lítica sobre las LCL no precargadas con péptido.

Por otro lado, como se ha descrito recientemente (22-25), las células manipuladas mediante DEP (dielectroforesis) mantienen su fenotipo y sus características diferenciadas. De acuerdo con la presente invención, se ha informado que este tipo de manipulación tampoco altera la actividad citolítica y la detección de la señal óptica (fluorescencia). Esta estrategia, por lo tanto, es adecuada para la identificación inmediata y el siguiente aislamiento y expansión de los clones de CTL activos, así como de otras poblaciones celulares que muestren una actividad citolítica frente a determinadas dianas celulares.

Además de las técnicas de formación de imágenes ópticas utilizadas en la presente demostración, se sabe que las técnicas de medición de la impedancia (6) permiten comprobar el estado de células individuales con un alto nivel de precisión. La técnica óptica presentada en la presente realización se pretende, por lo tanto, que sea solo un ejemplo de un método más general.

La Fig. 2 muestra detalles de células en un estado avanzado de lisis tras la interacción con los CTL. En particular, en la parte derecha de la figura se puede observar (flecha blanca) una célula diana lisada por tres CTL (flechas negras). La Fig. 3 (panel A) muestra las cinéticas de lisis en los agregados de los CTL/células diana. En B se señala que los CTL no preseleccionados no son líticos. Como puede observarse, la estrategia permite analizar la cinética de la lisis tras un contacto con los CTL e identificar los patrones de CTL con una elevada actividad citolítica.

La Fig. 4A muestra que un marcaje con calceína no modifica el mecanismo de lisis o el reconocimiento específico de los linfocitos con HLA-B35 (LCL) cargados con péptido de EBV de los CTL. En la Fig. 4B también se muestra que ni la dielectroforesis ni el tampón que contiene manitol tienen ningún efecto sobre estos mecanismos, un resultado que está alineado con lo que se han comprobado otros para el perfil de expresión génica (37) y la capacidad de

crecimiento de K562 (35, 36), que no resultan estar modificados por la dielectroforesis.

El mantenimiento de la especificidad de las reacciones de reconocimiento y de lisis en las condiciones experimentales utilizadas (tampón de manitol y desplazamiento a través de dielectroforesis) se ha comprobado adicionalmente en los experimentos mostrados en las figuras 5 y 6. En la figura 6 también se muestran cinéticas de la variación de intensidad de fluorescencia después de la lisis específica de las LCL procedentes de los CTL, que puede ya señalarse dentro de los primeros 8-10 minutos desde el tratamiento DEP (dielectroforesis), comenzando también a partir de un número limitado de células (n.º = 25, 30, 20, 27). En conclusión, se ha encontrado de forma sorprendente que la especificidad de la reacción inmunitaria permanece preservada en este contexto experimental. De hecho, no es absolutamente obvio que la reacción inmunitaria de lugar a un comportamiento selectivo también en presencia de un número extremadamente reducido de células. En particular, el entorno en el que este tipo de manipulación tiene lugar impide entre las células que, por el contrario, se produce en todas las otras metodologías. A pesar de esto, el hallazgo de la selectividad y especificidad de la reacción inmunitaria abre la puerta a una importante serie de enseñanzas de esta patente.

El hecho de que los efectores citotóxicos (los CTL en el ejemplo informado, pero también los linfocitos NK y otros) puedan enumerarse *ex vivo* en tiempo real y que este análisis no sea a base de "criterios indirectos de valoración" (por ejemplo, la expresión de un marcador de superficie específico del efector, la liberación de una lincina, la expresión de antígenos de diferenciación, etc.) sino más bien de la lectura cuantitativa en línea y en tiempo real de la eficacia lítica a un nivel de célula individual, es innovador y de una gran importancia. Se sabe, de hecho, que no todos los linfocitos T que reconocen un dado antígeno son líticos por igual (2, 28) y que el porcentaje de linfocitos de fenotipo maduro aumenta durante las vacunaciones (29). Se espera que el uso de la citotoxicidad directa como criterio de valoración correlacione en gran medida con el pronóstico clínico con respecto al uso de criterios indirectos de valoración y permita un control más preciso de la eficacia de las preparaciones de vacuna en la inducción de una inmunidad específica. Además, a menudo se observa la presencia de linfocitos T antitumorales en concomitancia con una recaída y el retorno de la enfermedad también en pacientes no vacunados de forma reciente (30).

Siendo la técnica de recuperación de células tras la manipulación (33) una técnica conocida, este procedimiento tiene implicaciones terapéuticas. El aislamiento y la recuperación de células efectoras con una elevada actividad lítica permite el cultivo "*in vitro*" de células altamente seleccionadas, con el objetivo de llevar a cabo estudios bioquímicos y de expandir las poblaciones seleccionadas. Ambas estrategias tienen profundas implicaciones en la inmunoterapia de tumores.

De hecho, el aislamiento de efectores citotóxicos de alta selectividad a partir de poblaciones heterogéneas (circulantes o "fijos" en las áreas linfáticas de drenaje) de células mononucleares permite (a) la expansión clonal de efectores antitumorales seleccionados aguas arriba, por la eficacia particular del mecanismo lítico; (b) la reselección de efectores durante la amplificación *ex vivo* de poblaciones clonales posiblemente inestables. Están disponibles las tecnologías de reinfusión *in vivo* con fines terapéuticos, posiblemente tras la estimulación con células dendríticas (31). La eficacia de la reinfusión local y/o sistémica de estos efectores, y la toma de la infusión autóloga también pueden controlarse a lo largo del tiempo y correlacionarse con el estado inmunitario y el curso de la enfermedad (31).

La posibilidad de la expansión *in vitro* de células altamente líticas cambiando, si es necesario, el fenotipo y la reinfusión de las mismas en pacientes que padecen neoplasia (terapia de transferencia de células adoptivas) ha sido sujeto de múltiples estudios (28-30, 32). En esta estrategia experimental, la identificación rápida de células efectoras con una elevada actividad lítica y la capacidad de generación de cargas celulares que tengan una importancia terapéutica manteniendo, no obstante, la estabilidad génica es aún un factor limitante.

La estrategia objeto de la presente patente es compatible con una reducción de los tiempos y una mejora del procedimiento de selección de células con elevada actividad lítica, lo que facilita, por un lado, la identificación de antígenos tumorales diana, por el otro la expansión de células que pueden utilizarse en inmunoterapia. Si, a modo de ejemplo, el método sugerido en (32) se considera para obtener una selección funcional de cepas útiles de células que tienen potencialmente una actividad de inducción de lisis en células diana, la mejora en la calidad de selección obtenida mediante la presente metodología se aprecia mejor. La técnica en (32) comienza a partir de la observación de que hay cepas de células, los TIL o linfocitos infiltrantes de tumor, que tienen la capacidad de infiltrarse en el tejido tumoral y de ejercer una actividad lítica frente a células carcinogénicas. También en este caso, la cantidad de TIL encontrados en los pacientes es menor que la necesaria para obtener una remisión de la enfermedad. El protocolo puede entonces resumirse en las siguientes etapas: 1) la obtención de una biopsia del paciente; 2) el tratamiento del tejido a fin de permitir la infusión *in vitro* de factores nutritivos y de crecimiento oportunos para las células deseadas, 3) después de que la etapa de cultivo ha terminado, la purificación de las cepas celulares de los TIL y de la eliminación de las células tumorales, 4) la reinfusión de las células así obtenidas en los pacientes. Se sabe que solo una fracción de los TIL obtenidos de este modo muestra actividades líticas y, por lo tanto, dado que para limitar los efectos secundarios no deseados la cantidad de células reinfundidas en el paciente no puede excederse, la terapia tiene una eficacia restringida. La metodología propuesta en la presente patente reduce de un modo significativo las limitaciones de la discutida en el presente documento, como 1) que la selección de células

efectoras puede extenderse a líneas celulares que existen también en la sangre periférica y no se limita a los TIL; 2) la selección funcional produce un conjunto de cepas cuya capacidad lítica es conocida; 3) permite mejorar el procedimiento de expansión de estas líneas celulares debido a la posibilidad de controlar en distintas etapas de expansión la estabilidad de las líneas celulares de interés; 4) reduce la carga de células necesaria para la terapia y, por lo tanto, del mismo material reinfundido en el paciente; proporciona una acción más dirigida. El punto 3) mejora de un modo significativo el estado de la técnica en referencia a la expansión de líneas celulares de tipo CTL las cuales se sabe que cambian el fenotipo lítico tras un determinado número de expansiones. En el caso extremo en el que la disponibilidad de una célula individual que tenga las características líticas deseadas esté aguas abajo de los procedimientos de selección y sea necesario conseguir cargas celulares que tengan valencias terapéuticas en el orden de algunos millones de células, se necesitan aproximadamente 25 o 30 ciclos de expansión.

Este número de ciclos es tal que no mantiene la estabilidad génica de las células implicadas, de forma que se generan subpoblaciones que tienen un fenotipo lítico distinto. La invención presentada enseña cómo resolver este problema. De hecho, la selección funcional de células puede repetirse en distintas fases del procedimiento de cultivo y, por ejemplo, cuando tras de 10 o 12 ciclos de cultivo estén disponibles algunos miles de células. La purificación de la línea celular puede reestablecerse a través de una aplicación extendida de la selección funcional divulgada anteriormente. De hecho, es posible mantener líneas celulares diana obtenidas mediante biopsia y repetir el método sugerido para eliminar células líticas que tengan un fenotipo no deseado. La eliminación de células líticas en este nivel de expansión es consistente con las tecnologías de selección a base de técnicas electrónicas y, por lo tanto, se obtienen otra vez líneas puras. Una expansión adicional durante una cantidad de ciclos equivalente a 10 o 12 produce una cantidad de células líticas que tienen cantidades adecuadas para aplicaciones terapéuticas. Incluso si en este punto el número de células es tal que impide un examen de la estabilidad del fenotipo lítico a un nivel de célula individual, la cantidad de ciclos de cultivo sin control del fenotipo es ahora muy reducida y, por lo tanto, las células pueden considerarse como reproducciones apropiadas de las originales.

La invención contempla adicionalmente el uso de cualquier dispositivo adecuado para manipulaciones de células que no modifican la actividad biológica de las células efectoras (en este caso los CTL).

Por otro lado, la invención se refiere al aislamiento de cada tipo de células (incluyendo linfocitos NK) que tenga la capacidad de lisar células diana.

Para finalizar, la invención se aplica a todas las patologías para las que la actividad citolítica de las células efectoras (los NK o los CTL) puede entonces dirigirse, como se observó anteriormente, principalmente a patologías neoplásicas, patologías infecciosas, patologías autoinmunitarias y patologías inflamatorias de tipo agudo y crónico.

Referencias

1. Bollard CM, Savoldo B, Rooney CM, Heslop HE. Adoptive T-cell therapy for EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disease. *Acta Haematol.* 2003; 110(2-3): 139-48.

2. Mariani E, Monaco MC, Sgobbi S, de Zwart JF, Mariani AR, Facchini A. Standardization of a micro-cytotoxicity assay for human natural killer cell lytic activity. *J Immunol Methods.* 1994; 172(2): 173-8.

3. Hillman GG, Roessler N, Fulbright RS, Pontes JE, Haas GP. 51Cr-release assay adapted to a 96-well format sample reading. *Biotechniques.* 1993; 15(4): 744-9.

4. Nagao F, Yabe T, Xu M, Yokoyama K, Saito K, Okumura K. Application of non-radioactive europium (Eu3+) release assay to a measurement of human natural killer activity of healthy and patient populations. *Immunol Invest.* 1996; 25(5-6): 507-18.

5. Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A. Calcein-acetoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8(6): 1131-5.

6. Yu N, Atienza JM, Bernard J, Blanc S, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi YA. Real-time Monitoring of Morphological Changes in Living Cells by Electronic Cell Sensor Arrays: An Approach to Study G Protein-coupled Receptors. *Analytical Chemistry.* 2006; 78(1), 35-43.

7. L. L. Sohn, O. A. Saleh, G. R. Facer, A. J. Beavis, R. S. Allan, D. A. Notterman. Capacitance cytometry: measuring biological cells one by one. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97, 10687-10690

8. Goldberg JE, Sherwood SW, Clayberger C. A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1999; 224(1-2): 1-9.

9. Bachy M, Bonnin-Rivalland A, Tilliet V, Trannoy E. Beta galactosidase release as an alternative to chromium release in cytotoxic T-cell assays. *J Immunol Methods*. 1999; 230(1-2): 37-46
10. Micheletti F, Canella A, Vertuani S, Marastoni M, Tosi L, Volinia S, Traniello S, Gavioli R. Supra-agonist peptides enhance the reactivation of memory CTL responses. *J Immunol*. 2000; 165(8): 4264-71.
- 5 11. Palmowski M, Salio M, Dunbar RP, Cerundolo V. The use of HLA class I tetramers to design a vaccination strategy for melanoma patients. *Immunol Rev*. 2002; 188: 155-63.
12. Bouma GJ, van der Meer-Prins PM, van Bree FP, van Rood JJ, Claas FH. Determination of cytotoxic T-lymphocyte precursor frequencies using europium labeling as a nonradioactive alternative to labeling with chromium-51. *Hum Immunol*. 1992; 35(2): 85-92.
- 10 13. Ikeda H, Chamoto K, Tsuji T, Suzuki Y, Wakita D, Takeshima T, Nishimura T. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Sci*. 2004; 95(9): 697-703.
14. Mukherjee P, Tinder TL, Basu GD, Pathangey LB, Chen L, Gendler SJ. Therapeutic efficacy of MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes and CD137 co-stimulation in a spontaneous breast cancer model. *Breast Dis*. 2004; 20: 53-63.
- 15 15. Rosenberg SA. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *J Intern Med*. 2001; 250(6): 462-75.
16. Hallett WH, Murphy WJ. Natural killer cells: biology and clinical use in cancer therapy. *Cell Mol Immunol*. 2004; 1(1): 12-21.
17. Wang Y, Botvinick EL, Zhao Y, Berns MW, Usami S, Tsien RY, Chien S. Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature*. 2005; 434: 1040-5.
- 20 18. Voldman J, Braff RA, Toner M, Gray ML y Schmidt MA. Holding forces of single-particle dielectrophoretic traps. *Biophys J*. 2001; 80, 531-541.
19. Gascoyne PR y Vykoukal J. Particle separation by dielectrophoresis. *Electrophoresis*. 2002; 23, 1973-83.
20. Fiedler S, Shirley SG, Schnelle T y Fuhr G. Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem. *Anal Chem*. 1998; 70, 1909-1915.
- 25 21. Manaresi, N., Romani, A., Medoro, G., Altomare, L., Leonardi, A., Tartagni, M. y Guerrieri, R. (2003) A CMOS Chip for individual cell manipulation and detection. *IEEE J. Solid-State Circuits* 38, 2297-2304.
22. Altomare L, Borgatti M, Medoro G, Manaresi N, Tartagni M, Guerrieri R y Gambari R. Levitation and Movement of Human Tumor Cells using a Printed Circuit Board Device Based on Software-controlled Dielectrophoresis. *Biotechnol Bioeng*. 2003; 82, 474-479.
- 30 23. Gambari R, Borgatti M, Altomare L, Manaresi N, Medoro G, Romani A, Tartagni M. y Guerrieri R. Applications to cancer research of "lab-on-a-chip" devices based on dielectrophoresis (DEP). *Technol Cancer Res Treat*. 2003; 2, 31-40.
24. Borgatti M, Altomare L, Baruffa M, Fabbri E, Breveglieri E, Feriotto G, Manaresi N, Medoro G, Romani A, Tartagni M, Gambari R y Guerrieri R. Separation of white blood cells from erythrocytes on a dielectrophoresis (DEP) based 'Lab-on-a-chip' device. *Int J Mol Med*. 2003; 15, 913-920.
- 35 25. Huang Y, Joo S, Duhon M, Heller M, Wallace B y Xu X. Dielectrophoretic cell separation and gene expression profiling on microelectronic chip arrays. *Anal Chem*. 2002; 74, 3362-3371.
26. Salter, R. D., y P. Cresswell. 1986. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J*. 5: 943-949)
- 40 27. Kuroki M, Hachimine K, Huang J, Shibaguchi H, Kinugasa T, Maekawa S, Kuroki M. Retargeting of cytotoxic T lymphocytes and/or natural killer cells to CEA-expressing tumor cells with anti-CEA antibody activity. *Anticancer Res*. 2005; 25(6A): 3725-32.
28. Wang RF, Rosenberg SA. Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev*. 1999; 170: 85-

100.

29. Rosenberg SA. Shedding light on immunotherapy for cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350(14): 1461-3.

30. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*. 2001; 411(6835): 380-4.

5 31. Zitvogel L, Terme M, Borg C, Trinchieri G. Dendritic cell-NK cell cross-talk: regulation and physiopathology. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006; 298: 157-74.

32. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(9): 666-75.

10 33. Aexandra B. Fuchs, Aldo Romani, Delphine Freida, Gianni Medoro, Melanie Abonnenc, Luigi Altomare, Isabelle Chartier, Dorra Guergour, Christian Villiers, Patrice N. Marche, Marco Tartagni, Roberto Guerrieri, Francois Chatelain y Nicolo Manaresi. Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples. *Lab Chip*, 2006; 6: 121-126

REIVINDICACIONES

1. Método para la selección de células del sistema inmunitario deseadas, que tengan propiedades efectoras/líticas de la diana entre una población de células del sistema inmunitario, que incluye las etapas de:
 - a) permitir que las células del sistema inmunitario recogidas anteriormente de un ser humano interactúen con células, en particular células tumorales y microorganismos;
 - b) comprobar el efecto de la interacción en la etapa a);
 - c) seleccionar, entre las células del sistema inmunitario que han interactuado con las células diana, en particular células tumorales y microorganismos, solo las células del sistema inmunitario que hayan mostrado propiedades efectoras/líticas de la diana;
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las etapas a), b) y c) se llevan a cabo desplazando células individuales por medio de un dispositivo miniaturizado que permite la manipulación en tiempo real de células efectoras individuales sin modificar la actividad citolítica de las mismas.
- 15 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las etapas a), b) y c) se llevan a cabo de forma que se permita cuantificar la presencia de efectores citotóxicos, es decir como linfocitos T y NK, y otros, en sangre periférica, infiltrados neoplásicos inflamatorios, ganglios linfáticos regionales de drenaje y en cualquier otro sitio o fluido biológico accesible del ser humano del que se recogieron anteriormente las células del sistema inmunitario.
4. Método para determinar una enfermedad residual mínima en pacientes de riesgo midiendo la actividad citolítica de linfocitos efectores T y NK antitumorales, de acuerdo con el método de las reivindicaciones 1 y 2.
- 20 5. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la actividad citolítica se mide ya sea mediante técnicas ópticas de formación de imágenes hechas posible por marcar anteriormente al menos dichas células diana, en particular células tumorales y microorganismos, o mediante técnicas de medición de la impedancia.
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye adicionalmente una etapa de recoger y expandir células del sistema inmunitario que se han seleccionado al final de la etapa c), para crear clones de efectores antitumorales seleccionados aguas arriba por la eficacia particular del mecanismo lítico.
- 25 7. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha etapa de expansión se lleva a cabo mediante la amplificación *ex vivo* y la reelección de efectores con características óptimas, de forma que se eliminan poblaciones clonales inestables, repitiendo las etapas a), b) y c) sobre las células del sistema inmunitario expandidas que se han seleccionado al final de la etapa c).
- 30 8. Uso del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un fármaco que incluye células del sistema inmunitario que se han seleccionado a través de dichas etapas a), b) y c) y/o de sus clones en un vehículo adecuado para una reinfusión *in vivo* para fines terapéuticos, posiblemente después de una estimulación con células dendríticas.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, para la preparación de un fármaco para el tratamiento de una patología que puede tratarse con la infusión de las células efectoras líticas seleccionadas y expandidas.

35

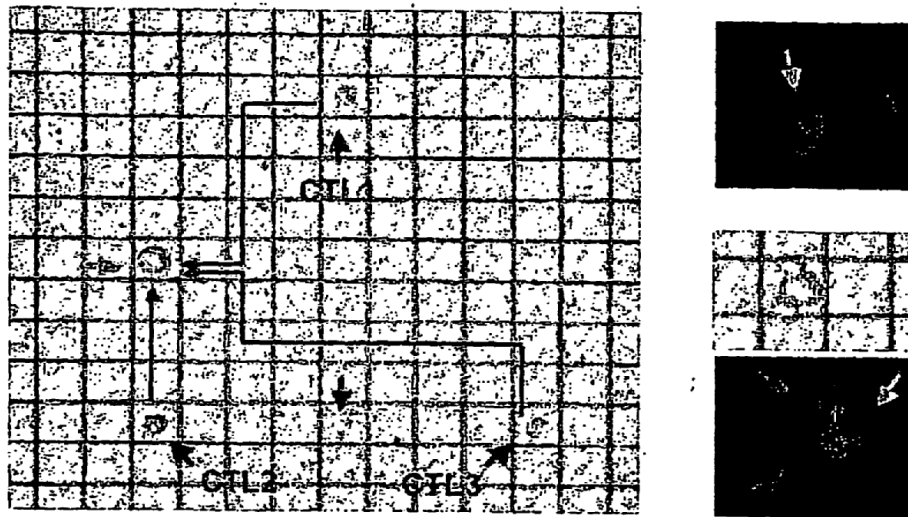


Fig. 1

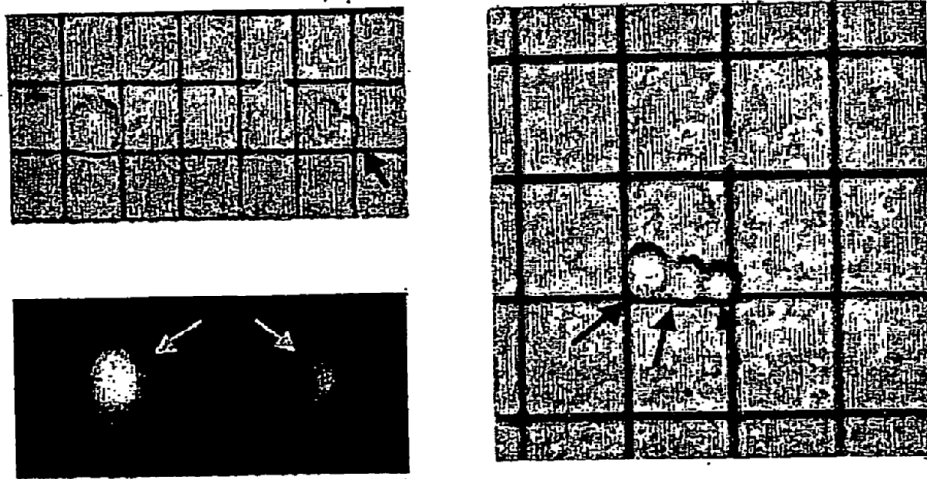


Fig. 2

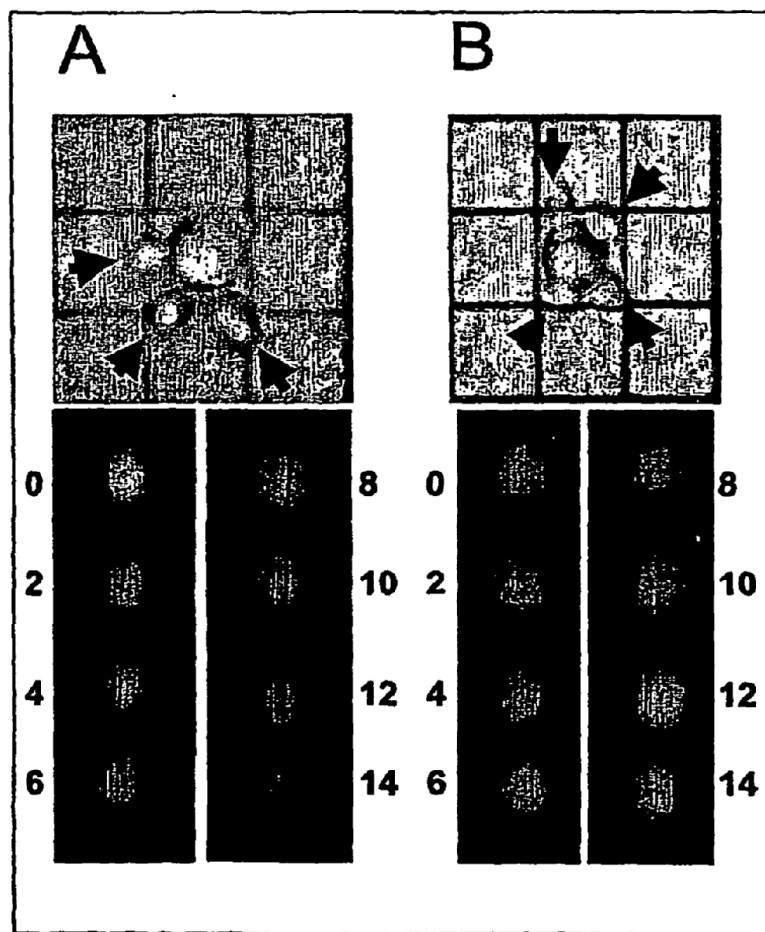


Fig. 3

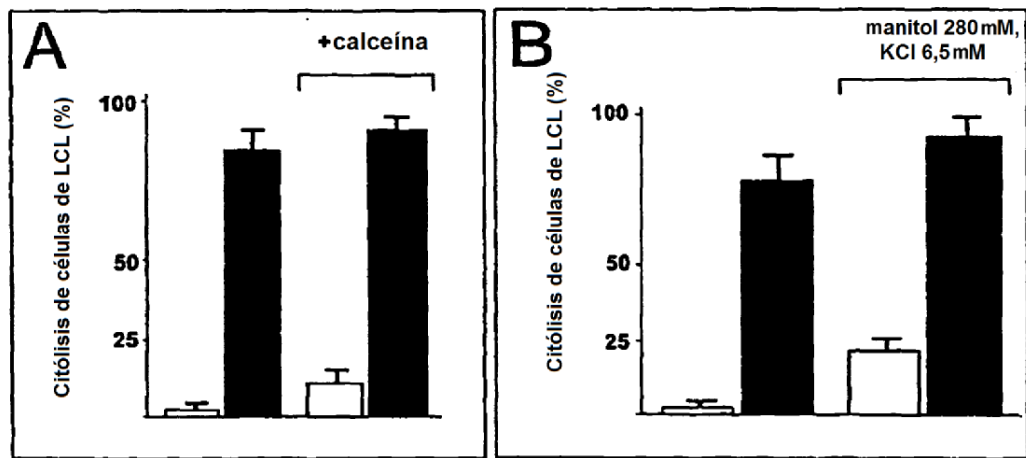


Fig. 4

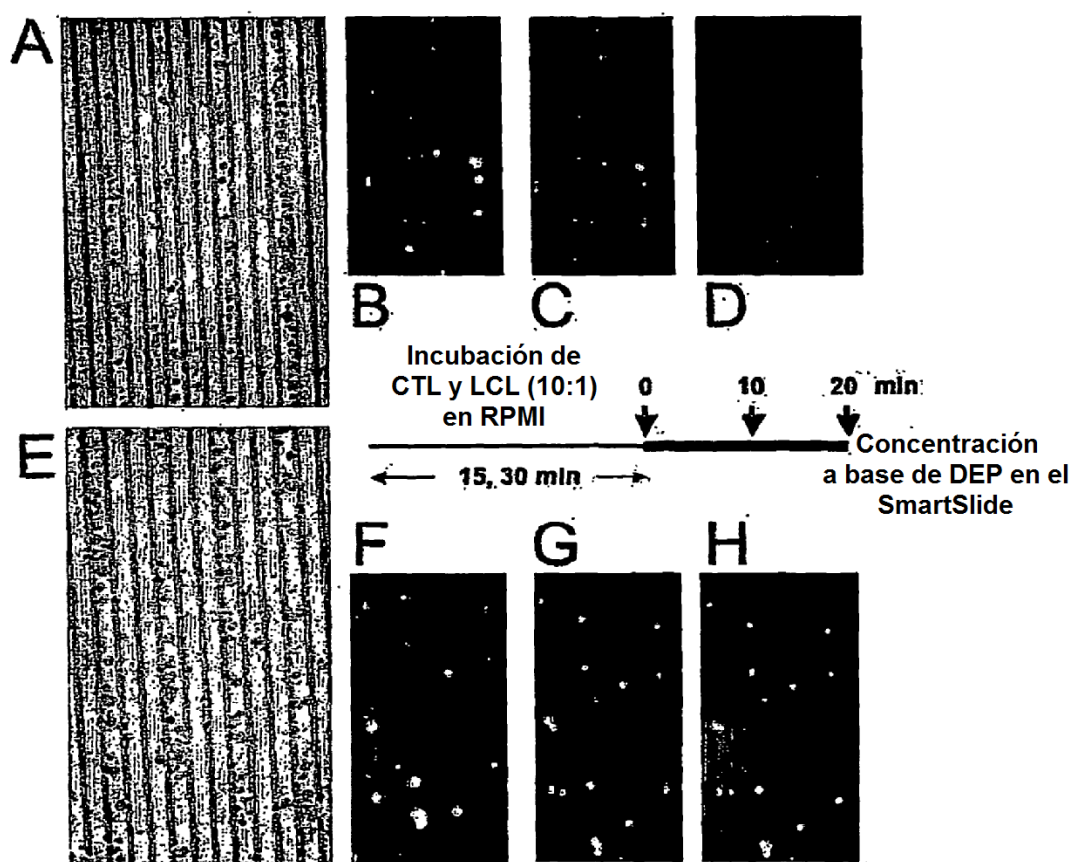


Fig. 5

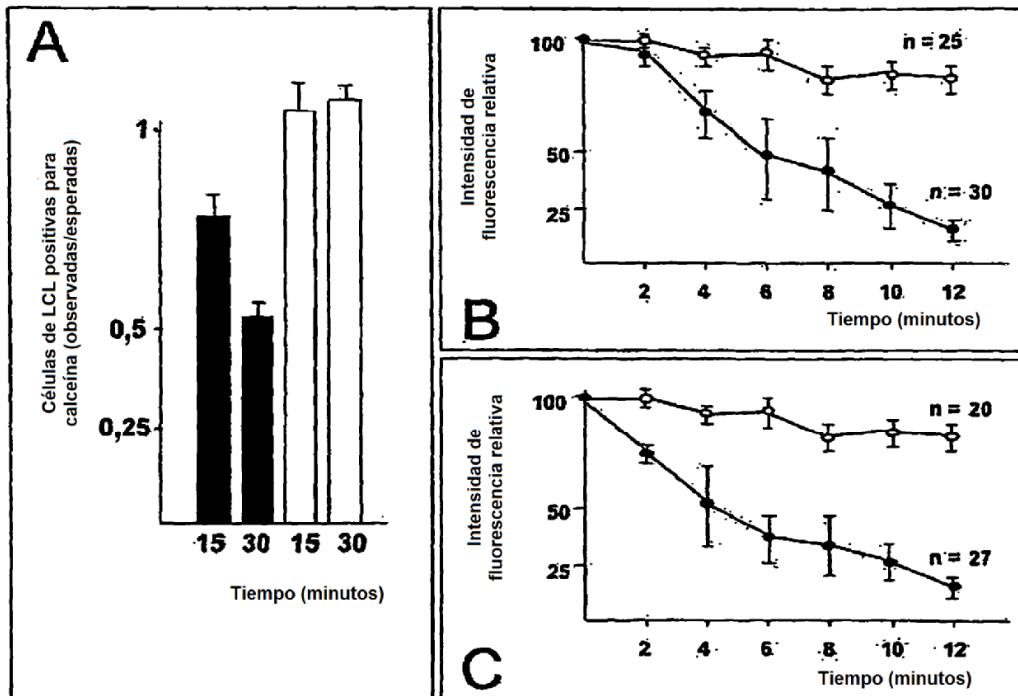


Fig: 6