

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 450**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2013 PCT/EP2013/069854**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14048920**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2013 E 13766319 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2900809**

54 Título: **Método para estimulación policlonal de células T mediante nanomatrices móviles**

30 Prioridad:

**25.09.2012 EP 12185939**

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

**13.09.2017**

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC GMBH (100.0%)  
Friedrich-Ebert-Strasse 68  
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**SCHEFFOLD, ALEXANDER y  
ASSENMACHER, MARIO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 632 450 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

Método para estimulación policlonal de células T mediante nanomatrices móviles

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en términos generales al campo de inmunología, en particular a procedimientos para la estimulación policlonal de células T mediante nanomatrices.

Antecedentes de la invención

10 Los anticuerpos contra CD3 son un elemento central en muchos protocolos de proliferación de células T. Inmovilizados sobre una superficie, anti-CD3 entrega una señal de activación y de inducción de proliferación mediante reticulación del complejo receptor de célula T sobre la superficie de células T. Inmovilizando anti-CD3 y anti-CD28 para entregar simultáneamente una señal y una señal co-estimulante puede incrementarse la proliferación (Baroja et al (1989), Cellular Immunology, 120: 205-217). En la publicación WO09429436A1 se usan superficies de fase sólida tales como partículas esféricas y platos de cultivo para inmovilizar los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Por lo regular la inmovilización sobre partículas esféricas se realiza sobre DynaBeads®M-450 que tienen un diámetro de 4,5 µm.

15 La publicación EP01257632B1 describe un método para estimular una población de células T mediante concentración simultánea de células T y enlace de una fracción de superficie celular, lo cual comprende: proporcionar una población de células en cuyo caso al menos una porción de la misma comprende células T; poner en contacto la población de células con una superficie, en cuyo caso la superficie tiene adherida a sí misma uno o más agentes que unen una fracción de superficie celular de al menos una porción de las células T y estimula al menos la porción de células T o una subpoblación de las mismas; y aplicar una fuerza que acciona de modo predominante la concentración de células T y la unión de la fracción superficial de células T, por lo cual se induce la estimulación de células T. El término fuerza, tal como se usa en la presente se refiere a una fuerza usada para accionar las células y puede incluir una variedad de fuerzas que funcionan de modo similar e incluyen una fuerza más grande que la fuerza gravitacional, una fuerza hidráulica, una fuerza de filtración generada por presión transmembrana, una fuerza centrífuga o una fuerza magnética. La publicación EP1257632B1 describe que las proporciones de partículas a células pueden variar; sin embargo, valores preferidos incluyen al menos 1:4 a 6:1, y una proporción preferida es de al menos 2:1 partículas esféricas por célula T. Por lo regular, se usaron DynaBeads®M-450 que tienen un tamaño de 4,5 µm acopladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en experimentos en una proporción de partícula esférica /célula T de 3:1. Una vez más, estos métodos usan superficies de fase sólida para co-inmovilizar agentes de estimulación de células T tales como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Estas superficies son del tamaño de célula y comparables con las mismas células T.

20 La publicación US2008/0317724A1 divulga que la presentación espacial de moléculas señal puede afectar radicalmente la respuesta de células T aquellas moléculas señal. Un ejemplo, cuando los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 se colocan en regiones predefinidas separadas de un sustrato, las células T incubadas en el sustrato secretan diferentes cantidades de interleuquina-2 y/o exhiben incrementos en calcio, dependiendo no sólo de los tipos sino también del espaciado de estas moléculas señal. Por ejemplo, fue generado un patrón con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, en cuyo caso los anticuerpos anti-CD3 ocuparon un elemento central rodeada por elementos satélites de anticuerpos anti-CD28 que estaban espaciados aproximadamente de 1 a 2 micras del elemento central de anti-CD3. Cuando los elementos del anticuerpo anti-CD28 estaban espaciados aparte aproximadamente 1 a 2 micras, la secreción de células T de interleuquina-2 (IL-2) fue incrementada en comparación con la situación en que los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 fueron presentados conjuntamente con las células T en elementos "co-localizados".

30 La publicación de Erin R Steenblock y Tarek M Fahmy (Molecular Therapy vol. 16 no. 4, 765-772, abril de 2008) usa nanopartículas (130 nm) de superficie sólida y muestra que estas nanopartículas estimulan las células T más débilmente que las micropartículas (8 µm). Los autores declararon que estos hallazgos están soportados por aquellos de informes previos (Mescher, MF (1992). J Immunol 149: 2402-2405.), Lo cual demuestra que las partículas con tamaño de micra, que son cercanas en tamaño a las células T, proporcionan estimulación óptima de células T. El estudio de Mescher demostró la importancia crítica de una gran área continua de contacto de superficie para una activación efectiva de CTL. Usando aloantígeno de clase I, inmovilizados sobre microesferas de látex, se encontró que los tamaños de partícula de 4 a 5 micras proporcionaban un estímulo óptimo. Por debajo de 4 micras, las respuestas disminuían rápidamente con la disminución del tamaño de partícula, y grandes cantidades de partículas pequeñas no podían compensar el tamaño sub-óptimo.

45 La publicación US8,012,750B2 divulga un dispositivo biodegradable para activar células T. El soporte biodegradable se formula primero con una forma tal como una microesfera. Los soportes biodegradables, recubiertos luego con un primer material proporcionan una superficie reactiva que es capaz de enlazarse a segundos materiales. Los segundos materiales tienen una superficie reactiva que permite un enlazamiento a las estructuras superficiales sobre una célula. El soporte biodegradable puede formularse con diversas formas. Las microesferas son una formulación preferida debido a la simplicidad de fabricación y la forma esférica permite un área de superficie incrementada para interacción con receptores celulares. De acuerdo con la publicación US8,012,750B2, las nanoesferas no proporcionan suficiente reticulación para activar células T naive y, por lo tanto, pueden usarse solamente con células T activadas previamente.

Una vez más, los datos experimentales fueron generados con esferas co-inmovilizadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 que se encuentran en intervalos de tamaño desde 4 a 24 micras con una media de 7 micras.

5 La publicación US2012/121649A1 divulga métodos para expandir células T específicas de antígeno, anti-tumorigénicas, los cuales comprenden administrar a un sujeto o a células in vitro un complejo de antígeno/MHC/molécula co-estimuladora/nanopartícula en una cantidad suficiente para estimular la expansión de una célula T específica de antígeno, anti-tumorigénica. La nanopartículas es de aproximadamente 1 nm a 10 nm. Fueron comparadas las capacidades de las nanopartículas de pMHC y pMHC/anti-CD28 mAb-conjugadas para estimular y activar células T de CD8+ naive cognadas. La nanopartículas puede comprender además uno o más recubrimientos biodegradables formados a partir de dextrano y otras moléculas. Por ejemplo, óxido de hierro (III) y PLGA pueden combinarse para formar nanopartículas que dan lugar a una particular de superficie sólida. La publicación US2012/121649A1 no divulga una estimulación policlonal de células T, Por Ejemplo con mAbs anti-CD3 y antiCD28 inmovilizados sobre nanopartículas.

15 La publicación US2010/284965A1 divulga métodos para activar células T administrando a las células nano- o micropartículas poliméricas que tienen un anticuerpo anti-CD28 adherido. Las micropartículas se encuentran en el intervalo entre 0,5 y 1000 micras y las nanopartículas en el intervalo entre 50 nm a menos de 0,5 nm. Las partículas están compuestas de PLGA y representan por lo tanto partículas de superficie sólida con forma esférica. Adicionalmente, la publicación US2010/284965A1 no divulga estimulación policlonal con las nanopartículas.

20 La publicación de Fahmy et al (2007, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, vol. 3, no. 1, páginas 75-85) divulga la unión de soportes nanoscópicos de medicamentos (30 nm) con una variedad de complejos de anticuerpos y péptidos para enlazarse a células T diana. Solamente se muestra el potencial de expansión in vivo de las nanopartículas recubiertas con pMHC. El objetivo del estudio se concentró en el diseño de un sistema multifuncional que puede facilitar la entrega mejorada de medicamentos a poblaciones específicas de células T. Fahmy et al. no menciona nada acerca de la estimulación policlonal con las nanopartículas.

25 La publicación US6117982A divulga una composición que comprende una micropartículas esférica acoplada con una pluralidad de moléculas de enlace que carecen de porciones Fc y que son específicas para CD2, CD3 u otros componentes enlazados al receptor de célula T. La micropartículas esférica es hidrofílica, estable y no inmunogénica en humanos y tiene un diámetro de aproximadamente 1 a 10 micrómetros y están hechas mediante reticulación de agarosa o dextrano.

30 La publicación US6117982A menciona que las partículas esféricas de tamaños más pequeños pueden hacerse por medio de la misma química, pero no se usan ni se divulgan nanopartículas específicas más pequeñas.

35 Dinauer et al (2005, Biomaterials, vol. 26, no. 29, páginas 5898-5906) divulgan nanopartículas con superficie modificada a base de material biodegradable que se usa para acoplamiento de anticuerpo con el fin de lograr sistema de soportes de medicamento selectivo. Nanopartículas de gelatina fueron conjugadas con el anticuerpo anti-CD3. Podría mostrarse la determinación específica según el tipo de célula como objetivo de las nanopartículas conjugadas con anti-CD3 en las células de leucemia de célula T humana positiva de CD3 y de linfocitos T primarios. Dinauer et al. no menciona nada acerca de estimulación policlonal con las nanopartículas.

40 Tomadas juntas, partículas esféricas o microesferas usadas en el estado de la técnica para activación policlonal de células T por medio de anticuerpos estimuladores de célula T inmovilizados por lo regular son partículas con formas uniformemente redondas del tamaño de la célula (la mayoría de los casos de 1 a 10 µm de tamaño). Las partículas esféricas de este tamaño tienen diversas desventajas con respecto a su potencial para interactuar con células T, así como respecto de su producción, manejo y seguridad en procedimientos clínicos de terapia con célula T.

1. Debido a la superficie sólida de la partícula esférica, el tamaño del área de interacción entre la partícula esférica y las células es limitado.

45 2. Su preparación es compleja y costosa en comparación con anticuerpos solubles y es especialmente conveniente para generar los en calidad de cGMP; por ejemplo, debido a su tamaño no es posible una filtración estéril, la sedimentación complica el manejo, es decir cantidad de partículas/volumen durante el llenado y la carga del anticuerpo.

3. Son inconvenientes para usarse para procedimientos in vitro y para generar productos terapéuticos de célula T para uso in vivo,

50 - puesto que tienen que añadirse a las células en proporciones definidas de célula/partícula esférica a una densidad definida células/partícula esférica por área de superficie,

-la adaptación de la fuerza de estimulación sólo es posible hasta cierto punto, puesto que la fuerza de estimulación de célula T se determina casi siempre por la densidad de anticuerpos sobre la superficie de la célula y no por la cantidad de partículas esféricas/célula

- la toma de alícuotas es inexacta debido a la sedimentación,
- no es posible una filtración estéril

-debido a su tamaño pueden afectar la viabilidad y la función de la célula y simplemente no pueden retirarse de las células mediante centrifugación. Por lo tanto, han sido desarrollados protocolos especiales para "retiro de partículas esféricas" o partículas biodegradables. Sin embargo, ambos métodos sufren de imprecisiones con respecto a la cantidad real de partículas esféricas residuales después del procedimiento de retiro, lo cual deja atrás cierto riesgo de efectos tóxicos si las partículas esféricas estimuladoras se inyectan en pacientes. Este problema es particularmente relevante debido al tamaño de las partículas, puesto que cada partícula individual por sí sola todavía puede haber retenido la capacidad de activar células T in vivo.

10 Por lo tanto, existe una necesidad de un método in vitro mejorado para la estimulación policlonal de célula T.

#### Resumen de la invención

De manera sorprendente fue encontrado que los agentes estimulantes policlonales de célula T, tales como anticuerpos, por ejemplo contra CD3 y CD28, adheridos a nano matrices que se caracterizan por una columna vertebral de matriz polimérica móvil (superficie no sólida) que puede estar incrustada dentro de los compuestos funcionales adicionales de la matriz, tales como nano cristales magnéticos, pueden usarse para estimular células T naive y de memoria in vitro, aunque su diámetro sea inferior a 1 µm, de preferencia inferior a 500 nm, más preferentemente inferior a 200 nm. Contrario a esto, se encontró que las partículas esféricas con superficie sólida del mismo tamaño que las nanomatrices usadas en la presente no son capaces de estimular células T en lo absoluto o a un nivel similar al de las nanomatrices, lo cual está en concordancia con la opinión bien establecida de la persona versada en la materia. Debido a su pequeño tamaño, las nanomatrices per se, sin anticuerpos adheridos a las mismas, no alteran la estructura, la función, el estatus de actividad o la viabilidad de las células; es decir, no causan perturbaciones en las células y no interfieren con análisis, experimentos y aplicaciones terapéuticas subsiguientes de las células estimuladas. En adición, de preferencia, la nanomatriz es biodegradable y no tóxica para las células vivientes; es decir, la nanomatriz es una entidad biológicamente inerte con respecto a las alteraciones de la función celular. Por lo tanto, la nanomatriz usada en el método de la presente invención mejora la estimulación in vitro de células T preservando la viabilidad de las células. Adicionalmente es posible la filtración estéril de las pequeñas nanomatrices, lo cual es una característica importante para la expansión a largo plazo de célula T in vitro en condiciones que son conformes con estándares rigurosos de GMP y es una opción valiosa para la aplicación clínica de las células T expandidas in vitro. Además, estas nanomatrices son bien adecuadas para usar en un sistema de cultivo celular estéril y cerrado, tal como se describe a manera de ejemplo en la publicación WO2009/072003 (CliniMACS®Prodigy, Miltenyi Biotec GmbH, Alemania).

Adicionalmente, de manera sorprendente se encontró que los agentes estimulantes de célula T tales como anticuerpos, por ejemplo contra CD3 y CD28, adheridos a nanomatrices pueden conjugarse con nanomatrices separadas (en lugar de conjugarse con la misma nanomatriz), que pueden mezclarse en lo sucesivo para uso optimizado. En general, la proporción de nanomatrices a células es superior a 100:1, de preferencia superior a 500:1, de la manera más preferible superior a 1000:1. Esto da lugar a la posibilidad de un ajuste fino de las nanomatrices usadas para estimulación de las células T diana; por ejemplo, facilita el procedimiento de producción y el control de calidad de las nanomatrices individuales y mejora la flexibilidad del reactivo, facilitando por ejemplo la optimización de las condiciones de activación para subconjuntos de célula T especializada mediante la titulación de diversas concentraciones y proporciones de CD3 y CD28.

40 En un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de una nanomatriz para la estimulación policlonal in vitro de células T, comprendiendo la nanomatriz

- a) una matriz de cadenas poliméricas móviles, en cuyo caso dicha matriz se caracteriza por una superficie no sólida, y
- b) adheridos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles uno o más agentes estimulantes que proporcionan señales de activación a las células T;

45 en cuyo caso la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para estimulación policlonal de células T y el método comprende poner en contacto una población de células T con una nanomatriz, en cuyo caso la nanomatriz comprende una matriz de cadenas poliméricas móviles y dicha matriz se caracteriza por una superficie no sólida y tiene, adheridos a sí misma, uno o más agentes que proporcionan señales de activación a las células T; de esta manera se activan y se inducen las células T para que proliferen; y nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, de preferencia 10 a 200 nm. De preferencia la nanomatriz es biológicamente inerte con respecto a las alteraciones de la función celular. Adicionalmente, de preferencia la nanomatriz es biodegradable.

Las células T estimuladas y opcionalmente expandidas, logradas con la presente invención pueden usarse en aplicaciones terapéuticas o no terapéuticas subsiguientes sin la necesidad de eliminar o retirar la nanomatriz debido a la propiedad de la nanomatriz de ser biológicamente inerte con respecto a las alteraciones de la función celular.

5 De manera alternativa, debido a que son solubles o coloidales, las nanomatrices pueden diluirse fácilmente, mediante pasos repetidos de lavado, a concentraciones por debajo del umbral de activación de célula T después del proceso de estimulación de célula T.

10 La nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, de preferencia de 10 a 200 nm. La nanomatriz es una matriz móvil que consiste en un material polimérico pero no tiene superficie de fase sólida en contraste con las partículas esféricas o microesferas. Los agentes tales como los anticuerpos anti-CD3 y/or anti-CD28 que permiten estimulación policlonal de células T se adhieren a las cadenas poliméricas móviles de la matriz. Dentro de la matriz pueden estar incrustadas sustancias adicionales tales como nanocristales magnéticos, tintes fluorescentes, etc., y agregar funciones adicionales a la nanomatriz sin alterar su estructura móvil básica, características superficiales o parámetros de interacción celular de la nanomatriz.

15 Esta movilidad, es decir la flexibilidad de las matrices poliméricas en soluciones acuosas incluso cuando están adheridas a superficies sólidas se conoce muy bien en el campo. Por ejemplo, una estimación cuantitativa de la flexibilidad o movilidad de dextrano y otros polímeros usados para aplicaciones biológicas o médicas se da en Bertholon et al. Langmuir 2006, páginas 45485-5490.

20 La movilidad introducida a la matriz de estimulación mediante el polímero usado se encuentra bien descrita en múltiples publicaciones para polisacáridos y nanocristales superparamagnéticos incrustados que se usan frecuentemente para tecnologías de generación de imágenes in vivo en situaciones clínicas. Esto reactivos son muy similares al tipo de reactivo que se usó aquí en varios de los ejemplos dados. Se conoce bien que a pesar del término "partícula", realmente estos reactivos no son comparables con partículas esféricas de superficie sólida:

25 "La mayoría de las (llamadas) nanopartículas coloidales, usadas para propósitos médicos, se recubren con polímero o polielectrolitos y realmente no pueden considerarse como esferas rígidas (Di Marco et al. Int J. Nanomed. 2007, página 618, renglón 5 y siguientes)".

30 Para ejemplificar directamente: esta característica típica de nanocristales súperparamagnéticos incrustados de polisacárido se describe de la mejor manera por la discrepancia en los valores de tamaño obtenidos mediante diferentes métodos que se usan para determinación de tamaño. De manera típica, el microscopio electrónico de transmisión usa muestras secas y por lo tanto determina principalmente el tamaño de los nanocristales incrustados que siempre se encuentran en el intervalo de 10 nm. Sin embargo, en contraste la dispersión dinámica de láser que también toma en consideración el tamaño de la matriz circundante en solución acuosa, determina diámetros mucho más grandes (por ejemplo 5-10 nm versus 80-150nm para AMI-25 que es un reactivo de contraste clínico que consiste en una matriz de dextrano y cristales de óxido de hierro incrustados. Esto significa que >99% del volumen total del complejo en solución acuosa está constituido por la matriz móvil (Wang et al. Eur. Radiol. 2001: página 2323). Para las matrices que fueron usadas, por ejemplo, en el ejemplo 1, la medición de tamaño reveló 30 nm (TEM) y 65 nm (DLS); por lo tanto, aproximadamente 80-90 % del complejo en solución acuosa consiste en la matriz móvil. Por lo tanto, en estos tipos de matrices móviles, el polímero móvil determina la conducta biofísica durante interacción con células antes que se cubra una partícula rígida o una superficie sólida que pueda recubrirse con una capa delgada de polímero usado para la adhesión. Por lo tanto, la flexibilidad o movilidad (motilidad) bien conocidas de las cadenas poliméricas en la matriz descrita es la característica determinante y diferencia crítica con los anticuerpos sobre microesferas, adheridos a la superficie sólida, que se usan para estimulación.

45 En resumen, estos ejemplos indican el conocimiento común actual sobre el comportamiento de matrices poliméricas móviles, flexibles en solución acuosa (prerrequisito para toda las aplicaciones de cultivo celular) y destacan el hecho de que también las propiedades biofísicas de los coloides recubiertos con polímero tales como las matrices de polisacárido que contienen óxido de hierro, usadas en este estudio pero no limitadas a las mismas, se determinan principalmente por la característica del material polimérico, sin tener en cuenta las sustancias incrustadas.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método in vitro para estimulación policlonal de células T y el método comprende poner en contacto una población de células T con una nanomatriz, y nanomatriz comprende

- 50 a) una matriz de cadenas poliméricas móviles en cuyo caso dicha matriz se caracteriza por una superficie no sólida; y
- b) adheridos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles, uno o más agentes estimulantes que proporcionan señales de activación a las células T; de esta manera se activan y se inducen las células T para que proliferen, en cuyo caso la nanomatriz es de 1 a 500 nm, de preferencia 10 a 200 nm, en tamaño, y la mayoría (es decir más del 50%), de preferencia más del 80 % y con mayor preferencia más del 90% y del modo más preferido más del 99% del volumen total de la nanomatriz en solución acuosa consiste en cadenas poliméricas móviles.

Si sustancias adicionales tales como nanocristales magnéticos, tintes fluorescentes, etc. están incrustados en la matriz, el complejo resultante consiste principalmente en cadenas poliméricas móviles lo cual constituye más de 50%, de preferencia más de 80% y con mayor preferencia más de 90%, y del modo más preferido más del 99% del volumen en solución acuosa.

5 Breve descripción de los dibujos

FIG 1: Nanomatrices CD3/CD28 para expansión de célula T naive.

Se estimularon células T naive CD4 y CD8 humanas clasificadas con nanomatrices conjugadas con CD3/CD28 a las concentraciones indicadas (concentración efectiva de CD3) en presencia de IL-2 durante 7 días. Se compararon las nanomatrices conjugadas con CD3 y CD28 en diversas proporciones. Como un control alto se usaron MACSiBeads conjugadas con CD3/CD28. Se da la cantidad absoluta de células viables en el cultivo el día 7.

10

FIG 2 A-C: Partículas sólidas con nano-tamaño versus nanomatrix para estimulación de células T. Partículas sólidas con nano-tamaño (AdemtechBeads, diámetro = 200 nm) fueron conjugadas con CD3/CD28 (1:1) y usadas para estimulación de células T naive de CD4 y CD8 a las concentraciones indicadas de CD3. Como parámetros de activación se analizaron la disminución de CD3 (FIG 2A, día 3) o la inducción de los marcadores de activación temprana de CD25 (día 3 FIG 2B, vía 5 FIG2C) mediante citometría de flujo. Los valores fueron normalizados al valor de las mismas células estimuladas por medio de nanomatrix de CD3/CD28 (100 ng/ml de CD3). Se dan los valores de 4 donantes diferentes.

15

FIG 3: Expansión de poblaciones de células T humanas clasificadas: células T humanas fueron clasificadas en varias subpoblaciones (células T totales, células T naive totales, células T naive CD4+, células T CD8+ naive) y estimuladas con nanomatrices conjugadas con CD3/CD28 a las concentraciones indicadas (concentración efectiva de CD3) y una proporción de CD3/CD28 de 1:1 en presencia de IL-2 durante 7 días. Como control alto se usaron conjugadas con CD3/CD28. Se da el número absoluto de células viables en el cultivo el día 7.

20

FIG 4: Expansión de Treg humanas: fueron aisladas CD25+ Treg a partir de PBMC mediante selección magnética de CD25 expandidos en la presencia o la ausencia de 100 nM de Rapamicina durante 14 días usando nanomatrix de CD3/CD28 (200 ng/ml de CD3) y alta dosis de IL-2. El día 7 las células fueron re-estimuladas adicionando nanomatrix fresca + IL-2. El día 14 se determinó la cantidad de Treg viables. Se determinó la frecuencia de células que expresan Foxp3 mediante inmunofluorescencia intracelular. Cada punto representa un donante individual saludable.

25

FIG 5: Comparación de CD3 y CD28 conjugados con diferentes nanomatrices versus conjugados con la misma nanomatrix. Fueron estimuladas células T naive humanas CD4 y CD8 clasificadas o bien con nanomatrices conjugadas con CD3/CD28, o bien con CD3 y CD28 conjugados con diferentes nanomatrices a las concentraciones indicadas (concentración efectiva de CD3) en la presencia de IL-2 por 7 días. Como control alto se usaron MACSiBeads conjugadas con CD3/CD28. Se da la cantidad absoluta de células viables en el cultivo el día 7 (A). Se representan resultados de dos donantes. Adicionalmente se etiquetaron las células con CFSE y la actividad proliferativa medida el día 5 después de activación (1 donante representativo) (B).

30

FIG 6: Comparación de anticuerpos solubles CD3 o CD28 con anticuerpos CD3 o CD28 conjugados con nanomatrices. Fueron aisladas células T naive de CD4 y CD8 y estimuladas in vitro en presencia de IL-2 usando CD3 soluble (0-10000ng/mL) sin CD28 (A) o en presencia de CD28 soluble (200 ng/ml) (B) y comparadas con CD28 conjugados con nanomatrices (200 ng/ml) y analizadas para marcadores de activación temprana CD25/CD69 el día 5 o para expansión (C) el día 7. Se analizaron 2 donantes en duplicados.

35

FIG 7: Eficiencia de transducción de subconjuntos de células T aisladas estimuladas con diversos agentes de estimulación. Los subconjuntos de células T, células T naive (T<sub>N</sub>, CD62L+ CD45RA+), de memoria central (T<sub>CM</sub>, CD62L+CD45RA-) y efectoras (T<sub>EM</sub>, CD62L-CD45RA-) activadas usando nanomatrices CD3/CD28, CD3 enlazados en placa + CD28 solubles o MACSiBeads conjugadas con CD3/CD28 y transducidas usando un vector retroviral vector que expresa un TCR específico para MART-1. Como como estándar se activaron PBMC totales usando CD3/CD28 solubles. La frecuencia de células transducidas que expresan el TCR de MART-1 fue determinado usando un tetrámero de MART-1/HLA-A2 etiquetado de modo fluorescente.

40

45

FIG 8: Subconjuntos de células T enriquecidos se expanden al menos como PBMC o mejor.

Se aislaron subconjuntos de células T CD8+ a partir de PBMC recién aislados de pacientes con melanoma y fueron estimulados con CD3 recubierto más CD28 soluble (CD3+CD28 en el gráfico) o con partículas esféricas de MACSi recubiertas con CD3/CD28/CD2 (MACSiBeads en el gráfico) o con nanomatrices de CD3/CD28 en presencia de IL2. Después de 2 días de estimulación, las células han sido transducidas para expresar TCR de MART-1. En el gráfico se reporta la expansión de pliegue de cada cultivo los días 13-15 después de la estimulación. Los valores de expansión de pliegues son relativos a PBMC estimulado por CD3 solubles que muestra una expansión de pliegue de 57.61±17.75

50

FIG 9: Células naive y de memoria central estimuladas con MACSiBeads o nanomatrix de CD3/CD28 muestran un fenotipo menos diferenciado terminalmente. PBMC recién se aislaron de leucaféresis de pacientes con melanoma.

5 Fueron enriquecidos subconjuntos de CD8<sup>+</sup> células T y luego estimulados con CD3+CD28 o MACSiBeads o nanomatriz de CD3/CD28 en presencia de IL2. En cambio PBMC fueron estimulados con CD3 solubles y IL2. Las células fueron transducidas para expresar TCR de MART-1 48 h después de la estimulación. Los datos aquí fueron obtenidos 13-15 días después de la estimulación de cada cultivo. Se muestran las frecuencias de A) tetrámero<sup>+</sup> MART-1 CD62L<sup>+</sup> y B) células tetrámero<sup>+</sup> MART-1 CCR7<sup>+</sup> entre CD8<sup>+</sup> células T. Después de retirar IL2 las células fueron teñidas para marcadores de CD27, CD57 o estimuladas con una línea de células de melanoma MART-1<sup>+</sup> HLA-A2<sup>+</sup> en presencia del anticuerpo CD107a y Monensin por 5 h. Análisis estadístico de C) MART-1 tetrámero<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>; D) MART-1 tetrámero<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> y E) células CD107a<sup>+</sup> entre frecuencias de CD8<sup>+</sup> células T.

10 FIG 10: Secreción de citocina después de re-estimulación de MART-1 en subconjuntos de CD8<sup>+</sup> células T. Subconjuntos de CD8<sup>+</sup> célula T a partir de PBMC recién aislados de pacientes con melanoma fueron aislados y estimulados con CD3+CD28 MACSiBeads o con nanomatriz de CD3/CD28 en presencia de IL2. Se estimularon PBMC del mismo paciente con melanoma con CD3 solubles y IL2. Después de 2 días de estimulación, las células han sido transducidas para expresar TCR de MART-1 y cultivadas por un total de 13-15 días. Después se lavaron las células de IL2 y se dejaron reposar por otros 2 días y luego fueron re-estimuladas con línea celular de melanoma MART-1<sup>+</sup> HLA-A2<sup>+</sup> durante 6h. La producción de citocina fue determinada mediante tinturado intracelular. Los gráficos muestran las frecuencias de A) IFN $\gamma$ <sup>+</sup>; B) IL2<sup>+</sup> y C) TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> células T.

Descripción detallada de la invención

20 En la comunidad científica había una opinión bien establecida de que las partículas que eran más pequeñas de 1  $\mu$ m no eran convenientes para estimular células T de manera efectiva puesto que tales pequeñas partículas no proporcionaban suficiente reticulación para activar células T. Por lo tanto, en términos generales las partículas esféricas o microesferas con superficies de fase sólida usadas para estimular células T de modo policlonal siempre eran mayores a 1  $\mu$ m en tamaño en el estado de la técnica; por lo regular eran del tamaño de la célula.

25 Ahora de manera inesperada los inventores encontraron que las nanomatrices que son más pequeñas que 1  $\mu$ m, preferentemente más pequeñas que 500 nm, más preferentemente más pequeñas que 200 nm, que tienen una matriz móvil y que tienen, adheridos a sí, agente(s) estimulante(s) policlonal(es) son convenientes para estimular células T. Para la presente invención es esencial que la nanomatriz que es más pequeña que 500 nm tenga una superficie que no es de fase sólida (lo que da lugar a una fase flexible y móvil) en contraste con partículas esféricas o microesferas del mismo tamaño (véase ejemplo 3). La nanomatriz es como una malla o red que consiste en un material polimérico móvil, de preferencia dextrano. La nanomatriz es muy plástica, lo que da lugar a la capacidad de acurrucarse en la membrana de superficie celular de las células diana, es decir las células T que van a ser activadas. Por lo tanto, la nanomatriz se enlaza con sus agentes adheridos a la matriz móvil a los receptores respectivos (antígenos) sobre la superficie celular, por lo cual la flexibilidad de la matriz permite interacción óptima con los ligandos. Hasta cierto grado la forma de la nanomatriz se adapta a la superficie de la célula diana por lo cual se extiende la superficie de contacto entre la nanomatriz y la célula diana. Debido al tamaño de la nanomatriz de 1 a 500 nm, de preferencia 10 a 200 nm, son demasiado pequeñas para causar perturbación en la célula, es decir que la nanomatriz es biológicamente inerte con respecto a las alteraciones de la función celular. Tales perturbaciones provocadas por el contacto directo célula/partícula esférica son problemáticas si se usan partículas esféricas o microesferas con un tamaño de 1  $\mu$ m o más grandes. Además, de preferencia, la nanomatriz es biodegradable y no es tóxica para las células gracias a la composición compuesta de material polimérico biodegradable, tal como un polímero de dextrano. En consecuencia, la nanomatriz es una entidad por completo biológicamente inerte con respecto a alteraciones de la función celular pero biodegradable. Por lo tanto, no hay necesidad de retirar la nanomatriz después de ponerla en contacto con las células T para estimulación y proliferación. No ocurren efectos de perturbación debido a la presencia de las nanomatrices en una composición de células T para análisis subsiguiente, experimentos y/o aplicaciones clínicas de estas células.

45 Además, debido a que son solubles o coloidales, las nanomatrices pueden diluirse fácilmente mediante pasos de lavados repetidos a concentraciones efectivas por debajo del umbral de activación de células T después del proceso de estimulación de célula T.

50 La matriz móvil de la nanomatriz tiene adheridos a la misma mobile uno o más agentes estimulantes que proporcionan señal(es) de activación a las células T, por lo cual se activan y se inducen las células T para que proliferen. Los agentes son moléculas que son capaces de enlazarse a una estructura de superficie celular e inducir la estimulación policlonal de las células T. Un ejemplo de agentes adheridos a la matriz móvil de la nanomatriz es el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (mAb) en combinación con una proteína co-estimulante tal como anti-CD28 mAb. Otros ejemplos son anti-CD2, anti-CD137, anti-CD134, ligandos Notch (muesca), por ejemplo de tipo Delta 1/4, Jagged1/2, ya sea solos o en diversas combinaciones con anti-CD3. Las células T que van a estimularse son células T naive, células T de memoria, CD4 Treg y células CD8 Treg. De preferencia, el agente estimulante adherido a la matriz móvil de la nanomatriz es un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (mAb) en combinación con la proteína co-estimulante anti-CD28 mAb.

Por lo tanto, en un aspecto la presente invención proporciona un método para estimulación policlonal de células T y el método comprende poner en contacto una población de células T con una nanomatriz, y nanomatriz comprende

a) una matriz de cadenas poliméricas móviles en cuyo caso dicha matriz se caracteriza por una superficie no sólida; y

b) adheridos a dicha matriz de cadenas poliméricas, uno o más agentes estimulantes que proporcionan señales de activación a las células T, por lo cual se activan e inducen las células T para que proliferen;

y en cuyo caso la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, de preferencia de 10 a 200 nm.

La nanomatriz puede ser biológicamente inerte con respecto a la alteración de la función celular.

5 Además, o modo alternativo, la nanomatriz puede ser biodegradable.

La nanomatriz puede ser de calidad cGMP para aplicaciones clínicas. La esterilidad puede lograrse, por ejemplo, mediante filtración estéril usando filtros con tamaño adecuado de poro (200 nm) o mediante otros métodos bien conocidos por la persona versada en la materia. El procesamiento GMP de los productos celulares se realiza con frecuencia en sistemas cerrados de cultivos celulares. El uso de la nanomatriz en sistemas de cultivo de GMP es ventajoso debido a:

10

- característica de la nanomatriz para pasar un filtro estéril

- una baja densidad de partícula o conducta coloidal que impide sedimentación más rápida de la matriz en comparación con las células T

- dosificación de la nanomatriz en relación con el volumen del cultivo antes que con la cantidad de células T.

15

La característica de la nanomatriz de ser capaz de pasar filtros estériles permite la adición a sistemas cerrados de cultivo celular que están equipados o pueden equiparse con filtros estériles, por ejemplo bolsas de cultivo celular (Miltenyi Biotec, Baxter, CellGenics), dispositivos GRex (Wilson Wolf manufacturing), WAVE Bioreactors (GE Healthcare), Quantum Cell Expansion System (Terumo BCT), CliniMACS® Prodigy (Miltenyi Biotec, véase Apel et al. 2013, Chemie Ingenieur Technik 85:103-110). La nanomatriz puede agregarse a sistemas cerrados de cultivo celular usando una jeringa para empujar la nanomatriz a través del filtro, o una bomba para sacar la nanomatriz a través del filtro desde una bolsa o un mundial (conectado a un adaptador de vial descargado).

20

Otros agentes usados para inducir proliferación de célula T (partículas esféricas magnéticas del tamaño de la célula, líneas celulares) no pueden pasar un filtro estéril. El uso de aquellos reactivos requeriría conectar agentes al sistema cerrado de cultivo celular usando un soldador de tubería estéril (por ejemplo Terumo, GE, Genesis). No todos aquellos soldadores de tubería están diseñados para operación dentro de un cuarto limpio de GMP. Por lo tanto, agregar un agente al sistema cerrado de cultivo celular a través de un filtro estéril proporciona una ventaja significativa.

25

Las partículas magnéticas rígidas de tamaño de célula, que se usan para inducir proliferación de célula T tienen una densidad superior que los linfocitos que incluyen células T (1,07 g/l) y por lo tanto se sedimentan más rápidamente que la nanomatriz. Los sistemas agitados de cultivo celular tales como el WAVE Bioreactor (GE Healthcare) evitan una sedimentación completa de las células mediante movimiento del contenedor usado para cultivo. El movimiento del contenedor aplica diferentes fuerzas a las células/partículas de diferente tamaño y densidad, lo cual da lugar a un movimiento relativo. La inducción de proliferación se reduce dentro del WAVE Bioreactor en comparación con un cultivo estático en matraces de cultivo celular.

30

El uso de las CD3CD28 MACSiBeads ("kit ExpAct T reg", "kit de expansión de célula T", Miltenyi Biotec) que utiliza partículas magnéticas rígidas del tamaño de la célula ha sido optimizado para ser usadas en una proporción dada de partículas esféricas por célula (por ejemplo 1:2), lo cual requiere la determinación del número de células T dentro del contenedor del cultivo y densidad celular definida, es decir un número optimizado de células y partículas esféricas por área de superficie, lo cual permite una interacción óptima de partículas esféricas y células, las cuales sedimentan todas en el fondo del recipiente de cultivo en el transcurso de unos minutos. Para una aplicación clínica de células T expandidas, esto da lugar a un paso de muestreo adicional que posiblemente haya afectado la esterilidad del producto. El uso de la nanomatriz de la presente invención permite dosificar el agente inductor de proliferación de célula T con base en el volumen del cultivo puesto que el reactivo puede dispersarse libremente en el medio y no se sedimenta. El volumen de la suspensión celular que contiene célula T puede determinarse mediante un sistema de balanza o cámara sin afectar la barrera de esterilidad. Dosificar el agente con base en la determinación de volumen permite un procedimiento de fabricación de productos celular completamente automatizado (por ejemplo usando el sistema CliniMACS® Prodigy) sin pasos manuales de conteo de células.

40

45

La puesta en contacto puede ocurrir, por ejemplo, in vitro en cualquier contenedor capaz de sostener células, preferiblemente en un ambiente estériles. Tales contenedores pueden ser, por ejemplo, frascos de cultivo, bolsas de cultivo, bioreactores o cualquier dispositivo que pueda usarse para cultivar las células (por ejemplo, el sistema de tratamiento de muestras de la publicación WO2009072003, es decir el sistema CliniMACS® Prodigy).

50

Por lo tanto, en un aspecto la presente invención proporciona un método para estimulación policlonal de células T en un sistema cerrado de cultivo celular, y el método comprende poner en contacto un cultivo celular que comprende una

población de células T dentro de dicho sistema cerrado de cultivo celular con una dosis de nanomatriz, y la nanomatriz comprende

a) una matriz de cadenas poliméricas móviles en cuyo caso dicha matriz se caracteriza por una superficie no sólida; y

5 b) adheridos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles uno o más agentes estimulantes que proporcionan señales de activación a las células T;

en cuyo caso la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, y

en cuyo caso dicha dosificación de nanomatriz se aplica de manera estéril a dicho sistema cerrado de cultivo celular, y dicha dosificación depende del volumen del cultivo celular en dicho sistema cerrado de cultivo celular.

10 Dicho volumen del cultivo celular puede determinarse por medio de una balanza o un sistema de cámara sin afectar la barrera de esterilidad.

La determinación y aplicación de dicha dosificación puede realizarse de manera automática.

15 La nanomatriz usada en la presente invención puede ser una nanomatriz en la cual al menos un primer agente y un segundo agente se adhieren a la misma matriz móvil. Las nanomatrices de este tipo se ponen en contacto con células T por lo cual se activan y se inducen las células T para que proliferen. La proporción del primero y del segundo agente, adheridos a la misma matriz flexible, puede encontrarse en el intervalo de las proporciones de 100:1 a 1:100, de preferencia entre 10:1 y 1:10, del modo más preferido entre 2:1 y 1:2.

20 Además, de manera sorprendente, se ha encontrado que la nanomatriz usada en la presente invención también puede ser una nanomatriz en la cual al menos un primer agente y un segundo agente están adheridos a matrices móviles separadas. Una mezcla de estas nanomatrices se pone en contacto con células T y de esta manera se activan y se inducen las células T para que proliferen (véase ejemplo 6). La proporción y/o concentración de la matriz móvil que tiene adherido a sí misma el primer agente y de la matriz móvil que tiene adherido a sí misma el segundo agente pueden variar para producir resultados óptimos de estimulación dependiendo del tipo de células T usados y/o agentes usados. Esto facilita la optimización de las condiciones de activación para conjuntos especializados de célula T mediante titulación de diversas concentraciones y proporciones de la matriz móvil que tiene adherido a sí misma el primer agente y matriz móvil que tiene adherido a sí misma el segundo agente. Es ventajoso que en términos generales la proporción de nanomatrices a células sea mayor a 100:1, de preferencia mayor 500:1, del modo más preferido mayor a 1000:1. La gran cantidad de nanomatrices por célula permite un ajuste fino de las nanomatrices etiquetadas por separado, lo cual sería imposible con proporciones más bajas de 1:10 a 10:1, usadas comúnmente mediante estimulación de células T usando partículas esféricas del tamaño de la célula.

30 La nanomatriz usada en la presente invención es una nanomatriz en la cual la matriz móvil está compuesta de un material polimérico, de preferencia biodegradable, que no es tóxico para las células, y en cuyo caso dicha matriz se caracteriza por una superficie no sólida. De preferencia, la nanomatriz usada en la presente invención es una nanomatriz en la cual la matriz móvil se compone de un polímero de dextrano. El uso de un material polimérico tal como dextrano para generar la matriz da lugar a una matriz móvil, flexible. La movilidad (flexibilidad o plasticidad) de la matriz es superior es superior con partículas más rígidas (que tienen una superficie de fase sólida) o partículas esféricas del mismo tamaño, es decir nanoestructuras para proliferación de células.

35 La nanomatriz usada en la presente invención puede ser una nanomatriz en la cual la matriz móvil es el único componente o al menos el principal de la nanomatriz sin tener en cuenta los agentes que están adheridos a la misma.

40 Pero la nanomatriz usada en la presente invención también puede ser una nanomatriz en cuyo caso la nanomatriz tiene nano cristales magnéticos, paramagnéticos, superparamagnéticos, o tintes fluorescentes incrustados en la matriz flexible, preferentemente incrustados en el polímero de dextrano.

La nanomatriz usada en la presente invención puede usarse en un método para estimular células T con esta nanomatriz, la cual no se retira en las aplicaciones subsiguientes de las células T estimuladas.

45 De modo alternativo, la nanomatriz usada en la presente invención también puede usarse en un método para estimular células T con esta nanomatriz, la cual se retira antes de aplicaciones subsiguientes de las células T estimuladas.

El método inventivo divulgada en la presente puede proporcionar una composición que comprende

a) una matriz de cadenas poliméricas móviles en cuyo caso dicha matriz se caracteriza por una superficie no sólida, y

b) adheridos a dicha matriz de cadenas poliméricas uno o más agentes que proporcionan señales de activación a las células T; de esta manera se activan y se inducen las células T para que proliferen;

y la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm, de preferencia 10 a 200 nm

ii) una población de células T que se activan y se inducen para que proliferen, lo cual se dispara por el contacto entre dicha nanomatriz y células.

5 La nanomatriz puede ser biológicamente inerte con respecto a la alteración de la función celular. La nanomatriz puede ser biodegradable.

Los agentes se adhieren a las mismas nanomatrices o a nanomatrices separadas alta densidad, con más de 25 µg por mg de nanomatriz, de preferencia con más de 50 µg por mg de nanomatriz.

Esta composición puede ser conveniente para generar productos terapéuticos de célula T para uso in vivo (composición farmacéutica). La composición también puede usarse en otros análisis y experimentos subsiguientes.

10 El método inventivo divulgada en la presente puede proporcionar una composición o una composición farmacéutica que comprende una población de células T estimuladas y células T (opcionalmente expandidas) producidas de acuerdo con el método de la presente invención. La composición farmacéutica puede comprender una población de células T estimuladas, producidas por el método de la presente invención, en la cual el método se realiza en un sistema cerrado de cultivo celular, tal como el sistema de tratamiento de muestras de la publicación WO2009072003.

15 Las nanomatrices pueden prepararse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen evaporación del disolvente, separación de fases, secado por spray o extracción de disolvente a baja temperatura. El procedimiento seleccionado debe ser simple, reproducible y escalable. Las nanomatrices resultantes deben ser de flujo libre y no deben agregarse con el fin de producir una suspensión uniforme capaz de inyectarse. La nanomatriz también debe ser estéril. Esto puede asegurarse, por ejemplo mediante filtración, un paso de esterilización terminal y/o mediante  
20 tratamiento aséptico. En el ejemplo 1 se describe una preparación de nanomatrices.

#### Definiciones

Los términos "matriz de cadenas poliméricas móviles" y "matriz móvil" tal como se usan en la presente tienen un significado intercambiable. El término "móvil" se refiere a la característica común y bien descrita de biopolímeros orgánicos tales como dextrano u otros sobre las nanopartículas (véase Bertholon et al. Langmuir 2006, páginas 45485-  
25 5490). Estos polímeros están compuestos de cadenas móviles (con motilidad), de preferencia altamente móviles, de modo que la matriz se caracteriza la ausencia de una superficie sólida como punto de adhesión para los agentes estimulantes tales como anticuerpos, lo cual se encuentra en fuerte contraste con las partículas esféricas o microesferas actualmente usadas que tienen por lo regular una superficie inflexible, rígida. Como resultado, la nanomatriz que comprende una matriz de cadenas poliméricas móviles es flexible y ajustable a la forma de la superficie de las células.  
30 Adicionalmente, como resultado la nanomatriz es una nanomatriz en la cual la mayoría (es decir más del 50%), de preferencia más del 80% y con mayor preferencia más del 90% y del modo más preferido más del 99% del volumen total de la nanomatriz en solución acuosa esta compuesta de cadenas poliméricas móviles.

El contacto entre la nanomatriz que tiene acoplados a sí misma uno o más agentes estimulantes y las células que van a estimularse se beneficia del hecho de que la nanomatriz no tiene una superficie fija, tesa, rígida lo cual permite que la  
35 nanomatriz se acurruque en las células. La matriz se compone de un material polimérico, de preferencia biodegradable o biocompatible, inerte que no es tóxico para las células. De preferencia la matriz se compone de cadenas poliméricas hidrofílicas, que obtienen movilidad máxima en solución acuosa debido a la hidratación de las cadenas. La matriz móvil es el único componente o al menos el principal de la nanomatriz sin tener en cuenta los agentes que están adheridos a la misma.

40 La matriz móvil puede ser de colágeno, proteínas purificadas, péptidos purificados, polisacáridos, glicosaminoglicanos, o composiciones extracelulares de matriz. Un polisacárido puede incluir, por ejemplo, ésteres de celulosa, almidón, goma arábiga, agarosa, dextrano, quitosán, ácido hialurónico, pectina, xantano, goma guar o alginato. Otros polímeros pueden incluir poliésteres, poliéteres, poliacrilatos, poliácridamidas, poliaminas, polietileniminas, polímeros poliquaternium, polifosfacenos, alcoholes polivinílicos, acetatos polivinílicos, polivinilpirrolidona, copolímeros en bloques o poliuretanos.  
45 De preferencia, la matriz móvil es un polímero de dextrano.

La matriz móvil define la propiedad de la nanomatriz de ser muy plástica, es decir flexible, lo que lleva a la capacidad de acurruarse en la membrana de superficie celular de las células diana, es decir las células T que se activarán y proliferarán. Por lo tanto, la nanomatriz se enlaza estrechamente con sus agentes adheridos a la matriz móvil a las células debido a que la movilidad de la matriz proporciona acceso óptimo de los ligandos o anticuerpos adheridos a sus  
50 receptores de superficie celular, o a antígenos. Debido a esta propiedad, la nanomatriz tiene la capacidad de proporcionar suficiente reticulación para activar células T, sin tomar en cuenta el pequeño tamaño de la estructura, es decir un tamaño inferior a 1 µm, de preferencia inferior a 500 nm, más preferentemente inferior a 200 nanómetros. La adaptabilidad de la nanomatriz causada por la nanoestructura móvil, flexible extiende el área de contacto entre la membrana celular y la nanomatriz dando lugar a uniones más eficientes entre las moléculas de superficie celular y los  
55 agentes adheridos a la matriz móvil.

En algunas realizaciones, la matriz móvil puede incorporar nano cristales magnéticos, paramagnéticos o superparamagnéticos u otras sustancias que agregan propiedades funcionales adicionales tales como los tintes fluorescentes, sin alterar las propiedades de estructura móvil básica y/o las propiedades superficiales, es decir la interacción con células diana.

5 El término "agente estimulante", que está adherido a la matriz móvil de la nanomatriz tal como se usa en la presente, se refiere a moléculas que son capaces de enlazarse a una estructura de superficie celular y contribuyen a una estimulación policlonal de las células T. Los términos "agente estimulante" y "agente estimulante policlonal", tal como se usa en la presente, tienen un significado intercambiable. Ejemplos de agentes adecuados para usar en la presente invención incluyen agentes tales como compuestos sintetizados, ácidos nucleicos y proteínas, incluyendo anticuerpos policlonales o monoclonales y fragmentos o derivados de los mismos, proteínas desarrolladas mediante bioingeniería, tales como proteínas de fusión. En un ejemplo, los agentes son proteínas mitogénicas. Las proteínas mitogénicas son dos o más proteínas que son capaces de proporcionar el requisito mínimo de dos señales a las células T con el fin de provocar que se activen las células T. Ejemplos de proteínas mitogénicas son anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD3 y anti-CD2 en combinación con una proteína Co-estimulante tal como, e incluyendo, proteínas específicas para una o más de las siguientes moléculas de la superficie de las células T: CD28, CD5, CD4, CD8, MHCI, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BBL, CD30L y LIGHT, incluyendo los ligandos correspondientes a estas estructuras de superficie, o fragmentos de las mismas. Otros agentes adecuados incluyen agentes capaces de entregar una señal a las células T a través de receptores de citocina tales como IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-gammaR, TNF-alfaR, IL-4R, y IL-10R, incluyendo anticuerpos monoclonales (mAbs) a estos receptores, proteínas de fusión con un extremo reactivo específico para estos receptores y los ligandos correspondientes a estos receptores o fracciones de los mismos. Otros agentes adecuados incluyen cualquier agente capaz de enlazarse a moléculas de adhesión celular sobre células T tales como mAbs, proteínas de fusión y los ligandos correspondientes o fracciones de los mismos a moléculas de adhesión en las siguientes categorías: cadherinas, ICAM, integrinas, y selectinas. Ejemplos de moléculas de adhesión sobre células T son: CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-selectina), y CD29/CD49d (VLA-4). Otros agentes adecuados incluyen agentes cualesquiera capaces de enlazarse a receptores de quimiocina, incluyendo aquellos en las categorías C-C y CX-C. Ejemplos de receptores de quimiocina asociados con la función de células T incluyen CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, y CXCR3.

30 Un agente puede adherirse o acoplarse a la matriz móvil mediante una variedad de métodos conocidos y disponibles en la técnica. La adhesión puede ser covalente o no covalente, electrostática o hidrófuga y puede realizarse mediante una variedad de medios de adhesión, que incluyen a manera de ejemplo medios químicos, mecánicos, enzimáticos u otros, por los cuales un agente es capaz de estimular las células. Por ejemplo, el anticuerpo a una estructura de superficie celular puede adherirse primero a la matriz o avidina o estreptavidina pueden adherirse a la matriz para unirse a un agente biotinilado. El anticuerpo a la estructura superficial de la célula puede adherirse a la matriz directamente o indirectamente, por ejemplo por medio de un anticuerpo anti-isótopo. Otro ejemplo incluye usar proteína A o proteína G, u otras moléculas que enlazan un anticuerpo no específico, que se adhieren a las matrices para enlazar un anticuerpo. De modo alternativo, el agente puede adherirse la matriz por medios químicos, tales como el entrecruzamiento a la matriz.

40 Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, haptenos y fragmentos de anticuerpo, y moléculas que son equivalentes de anticuerpo en que específicamente se enlazan a un epítopo sobre el antígeno. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales de cualquier isotipo (IgA, IgG, IgE, IgD, IgM), o una porción de los mismos se enlaza un antígeno, lo cual incluye pero no se limita a F(ab) y fragmentos de Fv tales como sc Fv, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y una librería de expresión de Fab.

45 El término "biológicamente inerte" tal como se usa en la presente se refiere a las propiedades de la nanomatriz que no es tóxica para las células vivientes y no induce alteraciones fuertes de la función celular por medio de interacción física con la superficie celular debido a su pequeño tamaño, excepto la función desencadenante específica del receptor/ligando de los ligandos o anticuerpos adheridos. Las nanomatrices, adicionalmente, pueden ser biodegradables; por ejemplo, pueden degradarse mediante actividad enzimática o quitarse mediante células fagocíticas. El material biodegradable puede derivarse de materiales naturales o sintéticos que se degradan en fluidos biológicos, por ejemplo medios de cultivo celular y sangre. La degradación puede ocurrir usando medios enzimáticos o puede ocurrir sin medios enzimáticos. El material biodegradable se degrada dentro de días, semanas o algunos meses, lo cual puede depender de las condiciones ambientales a las que se expone. El material biodegradable no debe ser tóxico ni antigénico para células vivientes y en humanos. Los productos de degradación tienen que producir subproductos no tóxicos. Un aspecto importante en el contexto de ser biológicamente inerte es el hecho de que la nanomatriz no induce una fuerte alteración en estructura, función, estatus de actividad o viabilidad de las células etiquetadas; es decir, no causan perturbaciones en las células y no interfieren con experimentos y aplicaciones terapéuticas subsiguientes de las células estimuladas. La irritación mecánica o química de la célula disminuye debido a las propiedades de la nanomatriz de ser muy pequeña, es decir en el intervalo de una nano-escala, y que tiene una matriz móvil que más bien se acurruca en la superficie celular antes que alterar la forma de la superficie celular o ejercer una gran fuerza de cizallamiento sobre las células; dando lugar, por ejemplo, a la ruptura de la membrana.

El término "PBMC" tal como se usa en la presente se refiere a células mononucleares sanguíneas periféricas aisladas de preparaciones de sangre periférica mediante el uso, por ejemplo, de un gradiente de densidad (por ejemplo Ficoll, PanColl). "PBMC" se componen de linfocitos y monocitos.

5 El término "células T purificadas" tal como se usa en la presente se refiere a poblaciones de células con un contenido aumentado de células T. Las células T pueden purificarse mediante métodos diferentes, que incluyen clasificación FACS®, enriquecimiento mediante partículas esféricas magnéticas (por ejemplo CD4 y CD8 MicroBeads, Miltenyi Biotec), agotamiento de células que no son T con partículas esféricas magnéticas, métodos con base en Ficoll (por ejemplo RosetteSep®, Stem Cell Technologies) o métodos de aislamiento de sangre entera (MACSxpress®, Miltenyi Biotec), así como también cribado sobre superficies recubiertas con anticuerpo.

10 Realizaciones

En una realización de la presente invención una primera nanomatriz con un tamaño de 1 a 500 nm, de preferencia 10 a 200 nm esta compuesta de una matriz móvil de un polímero de dextrano y tiene adherido a sí misma un agente, por ejemplo anti-CD3 mAb. Una segunda nanomatriz con un tamaño de 1 a 500 nm, de preferencia de 10 a 200 nm se compone de una matriz móvil de un polímero de dextrano y tiene adherido a sí misma otro agente, por ejemplo anti-CD28mAb. En este caso la nanomatriz usada en la presente invención es una nanomatriz en la cual al menos un primer agente y un segundo agente están adheridos a matrices móviles separadas.

Una mezcla de estas nanomatrices se pone en contacto con células T, activando e induciendo de esta manera las células T para que proliferen.

20 El ajuste fino de las nanomatrices para la estimulación de las células T se realiza fácilmente debido a la alta proporción de nanomatrices a células (normalmente superior a 500:1).

En otra realización de la presente invención, una nanomatriz con un tamaño de 1 a 500 nm, de preferencia de 10 a 200 nm se compone de una matriz móvil de un polímero de dextrano y tiene adherido a sí misma un agente, por ejemplo anti CD3 mAb. En este caso, la nanomatriz usada en la presente invención es una nanomatriz en la cual al menos un primer agente se adhiere a matrices móviles. La nanomatriz se pone en contacto con células T, por lo cual se activan y se inducen las células T para que proliferen. Un segundo agente o más agentes (múltiples) de co-estimulación, por ejemplo anti CD28mAb, pueden adicionarse como agentes solubles para optimizar o soportar la activación inducida por la nanomatriz con el primer agente adherido a la misma.

30 En otra realización de la presente invención, una nanomatriz con un tamaño de 1 a 500 nm, de preferencia de 10 a 200 nm se compone de una matriz móvil de un polímero de dextrano y tiene adheridos a sí misma dos agentes que proporcionan señales de activación a la célula, por ejemplo anti CD3mAb y anti CD28 mAb. En este caso, la nanomatriz usada en la presente invención es una nanomatriz en la cual al menos un primer agente y un segundo agente se adhieren a la misma matriz flexible.

Las nanomatrices de este tipo se ponen en contacto con células T, por lo cual se activan y se inducen las células T para que proliferen.

35 En otra realización de la presente invención, una nanomatriz con un tamaño de 1 a 500 nm, de preferencia de 10 a 200 nm se compone de una matriz móvil de un polímero de dextrano y tiene adheridos a sí misma múltiples agentes que proporcionan señales de activación a las células, por ejemplo anti-CD3mAb y anti-CD28 mAb, anti ICOS, anti-CD137 u otras moléculas co-estimulantes conocidas. En este caso la nanomatriz usada en la presente invención es una nanomatriz en la cual al menos un primer agente y otros múltiples agentes se adhieren a la misma matriz móvil.

40 Las nanomatrices de este tipo se ponen en contacto con células T, por lo que se activan y se inducen las células T para que proliferen.

45 En otra realización de la presente invención, una nanomatriz con un tamaño de 1 a 500 nm, de preferencia de 10 a 200 nm para usar en la presente invención se compone de una matriz móvil de un polímero de dextrano y tiene adheridos a sí misma uno o más agentes que proporcionan señales de activación a las células, por ejemplo anti CD3mAb y/o anti CD28 mAb. Además la nanomatriz tiene nanocristales magnéticos, paramagnéticos o superparamagnéticos, incrustados en el polímero.

50 La nanomatriz se pone en contacto con las células T, por lo cual se activan y se inducen las células T para que proliferen. De manera opcional, después de estimular las células T, la nanomatriz magnética, paramagnética o superparamagnética no enlazada puede retirarse aplicando un gradiente de campo magnético. De manera alternativa, las células etiquetadas con las nanomatrices magnéticas pueden separarse aplicando un gradiente de campo magnético, en particular un campo magnético de alto gradiente y subsiguiente expansión de las células T purificadas.

Aunque no hay necesidad de retirar la nanomatriz después de la activación y la proliferación de la población de células T debido a su propiedad de ser biológicamente inerte con respecto a la alteración de la función celular, opcionalmente la

nanomatriz podría retirarse en condiciones suaves de lavado, que sean suficientes para retirar lavando las nanomatrices de las células o el cultivo celular. Las nanomatrices pueden diluirse fácilmente mediante pasos repetidos de lavado a concentraciones efectivas por debajo del umbral de activación de células T. Este paso de remoción opcional se realiza de modo mucho más sencillo con las nanomatrices que con las partículas esféricas o microesferas que se conocen bien en el estado de la técnica, debido a su pequeño tamaño. Si la nanomatriz tiene nano-cristales magnéticos, paramagnéticos o superparamagnéticos, incrustados en el polímero, entonces el paso opcional de remoción puede realizarse aplicando un gradiente de campo magnético a la mezcla de células/nanomatriz.

El método de la invención puede usarse para expandir poblaciones seleccionadas de células T para usar en el tratamiento de enfermedades infecciosas o de cáncer. La población resultante de células T puede traducirse genéticamente y usarse para inmunoterapia, o puede usarse para análisis in vitro de agentes infecciosos tales como VIH. Puede lograrse la proliferación de una población de células CD4+ obtenidas de un individuo o un paciente, infectado por ejemplo con VIH, y células se vuelven resistentes a la infección con VIH, por ejemplo. Siguiendo la expansión de la población de células T a cantidades suficientes, las células T expandidas se re-infunden en el individuo o paciente. De manera similar puede obtenerse una población de linfocitos de infiltración de tumor a partir de un individuo aquejado con un cáncer y las células T se estimulan para que proliferen a cantidades suficientes y restauren al individuo. Adicionalmente, los sobrenadantes de cultivos de células T expandidas de acuerdo con el método de la invención son una fuente rica de citocinas y pueden usarse para mantener células T in vivo o ex vivo.

En otra realización de la presente invención, una nanomatriz tal como se describe en cualquier realización precedente puede usarse en un sistema cerrado de cultivo celular, por ejemplo el sistema de tratamiento de muestras de la publicación WO2009072003 o bolsas de cultivo celular (Miltenyi Biotec, Baxter, CellGenics), dispositivos GRex (Wilson Wolf manufacturing), bioreactores WAVE (GE Healthcare), sistema de expansión de células Quantum Cell Expansion System (Terumo BCT). Las nanomatrices tienen conectividad óptima con tal sistema cerrado de cultivo celular, pueden filtrarse fácilmente de modo estéril e integrarse al sistema cerrado de cultivo celular. Facilitan los procedimientos del sistema cerrado de cultivo celular, es decir la estimulación de las células T u otras células diana debido a que no se necesita remoción de las nanomatrices después del procedimiento de estimulación (y expansión) tal como se describe en la presente. La nanomatriz puede adicionarse en relación con el volumen del cultivo antes que con la cantidad de células T. El volumen del cultivo puede evaluarse mediante un sistema de balanza o de cámara (por ejemplo en el sistema de tratamiento de muestra de la publicación WO2009072003). El uso del método de la presente invención dentro de un sistema cerrado de cultivo celular tal como el sistema de tratamiento demuestra de la publicación WO2009072003 dar lugar a una manera segura y fácil de producir una composición farmacéutica de células T estimuladas debido al riesgo reducido de agentes contaminantes, por ejemplo, tales como células eucariotas, bacterias o virus (manejo más seguro y más rápido por parte del operador).

En otra realización de la presente invención, el cultivo de células T mediante el uso de la nanomatriz se realiza dentro de un campo magnético. En esta realización, la nanomatriz consiste en núcleos superparamagnéticos incrustados en la matriz móvil. Cuando se aplican a un campo magnético, se inducen fuerzas magnéticas en la nanomatriz y los ligandos, lo cual desencadena la activación de célula T; los receptores deben concentrarse para o mejorada de la proliferación. El cultivo de células T dentro de un campo magnético puede realizarse en una columna que consiste en una matriz ferromagnética (por ejemplo de la publicación WO2009072003) o en una bolsa, un frasco una cámara en proximidad cercana a un imán fuerte permanente.

Antes de la estimulación de las células T mediante la presente invención, las células T pueden identificarse y/o separarse o aislarse de la sangre, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), tejido del cuerpo o células de fluidos tisulares, de manera directa. Las células normalmente se identifican y/o se separan de muestras celulares de mamíferos tales como humanos, ratones o rata, pero especialmente de humanos y preferiblemente de sujetos bajo prueba y/o pacientes. La separación se realiza mediante métodos de clasificación bien conocidos en la técnica. Esto incluye, por ejemplo, cromatografía de afinidad o cualquier otra técnica de separación dependiente de anticuerpo que se conozca en la técnica. Cualquier técnica de separación dependiente de ligando que se conozca en la técnica puede usarse conjuntamente con ambas técnicas de separación, tanto positiva como negativa, que se basan en las propiedades físicas de las células. Una tecnología de clasificación especialmente potente es la clasificación magnética de células. Los métodos para separar magnéticamente las células se encuentran disponibles en el comercio, por ejemplo en Invitrogen, Stemcell Technologies, Cellpro, Advanced Magnetics, o Miltenyi Biotec. Adicionalmente las mezclas de células T, tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B u otras células que son parte de las muestras celulares hematológicas, tales como la sangre o leucaféresis, pueden usarse poblaciones altamente purificadas de células T para poner en contacto de acuerdo con la presente invención, incluyendo sus poblaciones de células T tales como células T CD4+, células T CD8+, células T NK, células T  $\gamma/\delta$ , células T  $\alpha/\beta$ , células T regulatorias CD4+CD25+Foxp3+, células T naive (CD45RA+CCR7+ y/o CD62L+) o células T de memoria central (CD45R0+CCR7+), células T de memoria efectora (CD45R0+CCR7-) o células T efectoras terminales (CD45RA+CCR7-). Las nanomatrices proporcionan suficiente actividad de entrecruzamiento al receptor de células T; por lo tanto no se requiere para activación un entrecruzamiento adicional, por ejemplo mediante células que expresan Fc-receptor tales como monocitos o células dendríticas.

Las poblaciones de células diana tales como las poblaciones de células T obtenidas por medio de la presente divulgación pueden administrarse ya sea solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes

- y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones de células. Brevemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población de células diana tal como se describe en la presente, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Una composición farmacéutica puede comprender a) una población de células T, en cuyo caso dicha células T han proliferado a cantidades terapéuticamente efectivas de acuerdo con la presente invención; y b) uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Una composición de este tipo puede contener trazas de nanomatrices que son biológicamente inertes con respecto a la alteración de la función celular pero pueden ser biodegradables, y no son tóxicas ni antigénicas para los humanos. Las composiciones de la presente divulgación se formulan preferiblemente para administración intravenosa.
- 5
- 10 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse de una manera apropiada a la enfermedad que va a tratarse (o prevenirse). La cantidad y frecuencia de administración se determinarán mediante tales factores como la condición del paciente y el tipo y la severidad de la enfermedad del paciente, aunque pueden determinarse dosis apropiadas mediante ensayos clínicos.

## Ejemplos

## 15 Ejemplo 1: Preparación de nanomatrices

- Nanomatrices magnéticas fueron producidas mediante una modificación del procedimiento de Molday y MacKenzie. 10 g de Dextran T40 (Pharmacia Uppsala, Suecia), 1,5 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  y 0,64 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  se disuelven en 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ , y se calientan a  $40^\circ\text{C}$ . Mientras se agita se adicionan lentamente 10 ml de NaOH de 4N y la solución se calienta a  $70^\circ\text{C}$  por 5 min. La suspensión de partículas se neutraliza con ácido acético. Para retirar los agregados se centrifugar la suspensión por 10 minutos a 2000 g y se filtra a través de un filtro con tamaño de poros de  $0.22 \mu\text{m}$  (Millex GV, Millipore, Molsheim, Francia). El dextrano no enlazado se retira mediante lavado en un campo magnético de alto gradiente (HGMF). El lavado mediante HGMF de las nanomatrices magnéticas se realiza en columnas de lana de acero hechas tal como se describe más adelante y se colocan en un campo magnético de aproximadamente 0,6 Tesla (MACS imán permanente, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania). Diez mililitros de suspensión de nanomatrix se aplican a una columna de  $15 \times 40 \text{ mm}$  de 2 g de lana de hierro. La columna cargada se lava con 30 ml de acetate de sodio de 0,05 M. Después de retirar la columna del campo magnético externo, las nanomatrices magnéticas son eluidas un acetato de sodio de 0,05 M. Las nanomatrices forman una suspensión marrón. La concentración relativa de partículas se da como una densidad óptica a 450 manómetros. El tamaño de las nanomatrices fue determinado mediante microscopía electrónica y dispersión dinámica de la luz como  $30 \pm 20 \text{ nm}$  (e.m.) y  $65 \pm 20 \text{ nm}$  (DLS). Contenido de dextrano y contenido de magnetita de la matriz dentro de la solución coloidal fueron determinados en el intervalo de aproximadamente 3,5 mg/ml y 4,8 mg/ml, respectivamente, dando lugar aproximadamente a una proporción de 40:60 p/p. Con base en la densidad de la nanomatrix seca de 2,5g/mL, determinada por medio de un picnómetro y las densidades conocidas de dextrano y magnetita de 1,6 g/ml y 5,2 g/ml, respectivamente, el volumen de dextrano puede calcularse y se obtiene aproximadamente 70% para la nanomatrix seca. Las nanomatrices muestran una conducta superparamagnética, tal como se determina mediante mediciones de susceptibilidad. El tamaño de los microcristales de ferrita atrapados se determinó a partir de mediciones magnéticas en 10 nm.
- 20
- 25
- 30
- 35

- Anticuerpos CD3 (clon OKT3) y anticuerpos CD28 (clon15E8) (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania) fueron conjugados con las mismas nanomatrices o nanomatrices separadas mediante química estándar de bioconjugación (Bioconjugate Techniques, 2a edición, por Greg T. Hermanson, publicado por Academic Press, Inc., 2008).
- 40

## Ejemplo 2: Expansión de células T usando nanomatrices a diversas concentraciones y proporciones de CD3/CD28 versus partículas esféricas CD3/CD28 MACSiBeads

- Los reactivos del Estado de la técnica actual para activación de células T altamente purificadas comprenden activar anticuerpos frente a CD3/CD28 inmovilizados, ya sea sobre las superficies de un plato de cultivo de células o partículas grandes del tamaño de las células ( $4\text{-}5 \mu\text{m}$ ). Ambas técnicas son susceptibles de error y técnicamente son difíciles de realizar y estandarizar, especialmente en condiciones de productos compatibles con GMP. En contraste, las nanomatrices pueden prepararse fácilmente y usarse de manera conveniente para cultivos celulares en condiciones de GMP. Por lo tanto, comparamos el potencial de activación de células T analizando el potencial de expansión de las nanomatrices recubiertas con CD3/CD28 a diversas concentraciones y proporciones de CD3/CD28 con partículas esféricas de estimulación de células que están disponibles comercialmente (MACSiBeads,  $\varnothing 4,5 \mu\text{m}$ , Miltenyi Biotec GmbH). Como puede verse en la FIG 1, las nanomatrices expanden células T de modo eficiente incluso a concentraciones muy bajas de CD3 (20 - 100 ng/ml) las cuales también se usan de manera típica para CD3/CD28 solubles en la presencia de células accesorias que proporcionan entrecruzamiento. Además de la concentración de anticuerpo, la proporción de CD3/CD28 también puede influir la activación de células proporcionar un medio adicional para optimizar el cultivo de células T. La expansión a dosis óptimas (20 - 300 ng/ml) fue similar o mejor que el reactivo estándar (MACSiBeads). A dosis superiores, la expansión se redujo debido a la sobreestimulación de las células T (muerte celular inducida por activación), un fenómeno conocido que ocurre a un grado demasiado alto de estimulación de TCR. Tomados juntos, estos resultados muestran que las nanomatrices recubiertas con CD3/CD28 pueden activar y
- 45
- 50
- 55

expandir eficientemente células T a concentraciones muy bajas de anticuerpo y sin la necesidad de entrecruzamiento adicional.

Ejemplo 3: Comparación de CD3/CD28 conjugados con nanomatrices versus partículas sólidas de 200 nm y 300 nm

5 Tal como se ha resumido antes, los reactivos disponibles en la actualidad para activación de células T pueden partirse en dos grupos. Anticuerpos solubles estimulantes, por ejemplo frente a CD3 y CD28, requieren inmovilización ya sea sobre la superficie del plato de cultivo celular o mediante receptores de células accesorias, por ejemplo receptores Fc de inmunoglobulina. Los reactivos que no dependen de un paso de entrecruzamiento extra que va usarse para la activación de células T, por ejemplo para estimular células T altamente purificadas en ausencia de células accesorias, se basan en partículas del tamaño de la célula ( $\varnothing$  4-5  $\mu$ m) recubiertas con anticuerpos CD3 y CD28 estimulantes. Se conoce que las partículas sólidas por debajo de un diámetro crítico de aproximadamente 1  $\mu$ m no son adecuadas para expandir apropiadamente células T. Para mostrar la capacidad única de activación de las nanomatrices recubiertas con CD3/CD28 ( $\varnothing$  50-200 nm), se comparó su actividad de activación con partículas sólidas de tamaño similar (200 nm, y 300 nm) versus partículas del tamaño de la célula ( $\varnothing$  4,5  $\mu$ m). Puesto que las partículas sólidas pequeñas habitualmente no conducen la expansión de células T, se analizaron de forma temprana los marcadores de activación de células T (aumento de sobre-regulación de CD25 y pérdida de expresión de CD3) para tener una selección sensible para activación de células T. CD25 se sobre-regula dentro de las primeras 24-48 horas siguientes a la estimulación de células T. Debido a que la sobre-regulación de CD25 inducida por TCR se soporta además por IL-2, se adicionó también IL-2 a las condiciones de cultivo para maximizar la sensibilidad del ensayo. Otro resultado directo de la estimulación con TCR es la sub-regulación del receptor de células T que puede analizarse por la pérdida de expresión de CD3 sobre la superficie celular. Se cultivaron células T con nanomatrices recubiertas con CD3/CD28 (100 ng/ml CD3) o partículas sólidas con un diámetro de 4,5  $\mu$ m (MACSiBeads) o 200 nm (Ademtech beads), todas recubiertas de modo covalente con anticuerpos CD3 y CD28. Se usaron MACSiBeads a una proporción óptima de 1:1 mientras que las partículas de 200 nm fueron tituladas para lograr una dosis activa de CD3 y CD28 en el intervalo de 25-3000 ng/ml CD3. Los días 3 y 5 se midió la frecuencia de células T CD25+ y el día 3 se midió la intensidad de expresión de CD3.

25 Como puede verse en las FIG 2A, B y C las nanomatrices conducen a una fuerte activación de la dosis óptima (100 ng/ml) tal como se muestra mediante sobre-regulación de CD25 [FIG 2B (día 3), FIG 2C (día 5)] y sub-regulación de CD3 (FIG 2A) que ocurrió a niveles similares como las partículas esféricas MACSiBeads del tamaño de la célula. En contraste nítido no se vio sobre-regulación de CD25 y casi no se vio sub-regulación de CD3 para partículas sólidas de 200 nm incluso a concentraciones 30 veces superiores de CD3/CD28. Incluso el día cinco, las partículas sólidas de 200 nm no fueron capaces de inducir expresión de CD25 a un nivel similar al de la nanomatriz. Solamente a concentraciones altas (5-30 veces superiores que para la nanomatriz), hubo una ligera sobre-regulación observada que alcanzaba aproximadamente 50-70% de los niveles de la nanomatriz.

35 Estos datos muestran que a pesar de su pequeño tamaño, las nanomatrices móviles en realidad tienen un potencial único para activar células T si se comparan con partículas de tamaño similar con una superficie sólida. El experimento de titulación también muestra que la falta de activación por parte de las partículas sólidas de 200-300 nm de tamaño, recubiertas con CD3/CD28 no puede compensarse simplemente mediante dosis superiores de partículas, pero obviamente existe una calidad diferente de señal de activación inducida por la nanomatriz.

Ejemplo 4: Expansión de subconjuntos purificados de células T

40 Tal como se indicó antes, diversos subconjuntos de células T pueden tener diferentes requisitos de activación. En particular, las células T naïve son difíciles de activar en ausencia de células accesorias. Además, las células T de CD4 y CD8 pueden tener necesidades diferentes cuando se activan solas o en presencia de tipos adicionales de células. Para mostrar que todos los subconjuntos de células T pueden expandirse igualmente bien por las nanomatrices, se activaron células T naïve CD4 y CD8, el total de células T naïve o el total de células T con nanomatrices a la dosis y composición indicadas o MACSiBeads y se comparó su expansión. Tal como se muestra en la FIG 3, todos los subconjuntos pueden expandirse eficientemente mediante nanomatrices y a un nivel comparable con el cultivo el estándar de MACSiBead.

Ejemplo 5: Expansión de células T regulatorias CD25+Foxp3+ (Treg)

50 Treg son de particular interés para aplicaciones terapéuticas para trasplantes, inflamación autoinmune crónica y Treg son difíciles de expandir in vitro sin pérdida de actividad reguladora, es decir expresión de Foxp3. Por lo tanto, también se analizó si células Treg seleccionadas por CD25 (pureza de Foxp3 típicamente de 60-90%) de diversos donantes pueden expandirse usando nanomatrices. Para apoyar el crecimiento de Treg versus células T convencionales, la expansión fue hecha en presencia de Rapamycina de 100 nM, un medicamento bien descrito que inhibe el crecimiento convencional de células T. Tal como se muestra en la FIG 4, 14 días después de cultivo, Treg puede expandirse 10-20 veces (sin Rapa) o 5-10 veces (con Rapa). Tal como se ha descrito antes sin Rapa la pureza de Foxp3 era altamente variable (10-75%) mientras que en la presencia de Rapa, la pureza fue siempre >50%.

55 Toma estos resultados muestran que las nanomatrices pueden usarse incluso para activar y expandir Treg en el cultivo.

Ejemplo 6: Comparación de activación de células T mediante CD3/CD28 conjugados con la misma nanomatriz versus CD3 y CD28 conjugados con nanomatrices separadas.

5 En diversas aplicaciones de reactivos de activación de células T con base en CD3 y CD28, se describe que ambos anticuerpos han sido inmovilizados sobre la misma superficie para activación óptima. Por lo tanto, también se ha ensayado si esto se requiere también para CD3 y CD28 conjugados con nanomatrices. Se comparó la expansión de células T naive purificadas, activadas por una nanomatriz de CD3/CD28 versus nanomatriz CD3 + nanomatriz CD28 mezcladas a diferentes proporciones/concentraciones. Se analizó la expansión (día 5) y la división celular (día 7), tal como se mide mediante la dilución de Violetye. Tal como se muestra en la FIG 5A, B la estimulación con la nanomatriz CD3 sola no indujo expansión significativa y solamente pueden observarse unas pocas divisiones de la célula, tal como se espera para células T naive que dependen de una señal co-estimulante. Sin embargo, la adición de la nanomatriz de CD28, ya a 10-50 ng/ml indujo actividad plena de división de célula y también expansión de cantidades de células T que era similar a la de la nanomatriz de control de CD3/CD28 o a las partículas esféricas estándar MACSi-Beads. Estos datos muestran claramente que ambos anticuerpos pueden conjugarse con nanomatrices separadas, las cuales pueden mezclarse después para uso optimizado. Esto facilita el procedimiento de producción y el control de calidad de las nanomatrices individuales y mejora la flexibilidad del reactivo, facilitando por ejemplo la optimización de las condiciones de activación para subconjuntos especializados de células T mediante la titulación de diversas concentraciones y proporciones de CD3 y CD28 (ajuste fino).

Ejemplo 7: El efecto de conjugación de CD3 o CD28 solubles con la nanomatriz.

20 Para excluir la posibilidad de que puedan lograrse resultados similares a los de la nanomatriz recubierta con CD3 y/o CD28 mediante el uso de los anticuerpos solubles respectivos, se compararon los efectos estimulantes de la nanomatriz recubierta con CD3 o CD28 con anticuerpos solubles a diversas concentraciones para demostrar que la conjugación de los anticuerpos con la matriz realmente es el paso crítico para obtener una buena activación de células T. Se adicionó IL-2 a todos los cultivos. Tal como se muestra en la FIG 6A un CD3 soluble sólo no indujo una sobre-regulación significativa de los marcadores de activación temprana CD25 y CD69 en células T naive en un intervalo amplio de concentraciones (10-10000 ng/ml) mientras que la nanomatriz recubierta con CD3 (100 ng/ml CD3) indujo expresión de CD25/CD69 en 20-60% de las células. En presencia de una cantidad de saturación (200 ng/ml) de CD28 soluble como co-estimulante (FIG 6B), CD3 soluble también indujo expresión de CD25/CD69 en aproximadamente 20-40% de las células a las dosis más altas ensayadas (100-10000 ng/ml). En contraste, la nanomatriz recubierta con CD3 (100 ng/ml CD3) indujo expresión de CD25/CD69 en 40-70% de las células.

30 También se ensayó el efecto de la conjugación de anticuerpos de CD28 con la nanomatriz. Puesto que los efectos de la co-estimulación se visualizan de la mejor manera bajo la estimulación de CD3 subóptima, se tituló CD28 ya sea soluble o conjugado con la nanomatriz en presencia de CD3 soluble con un cultivo de células T naive. Tal como se muestra en la FIG 6C, CD3 soluble sólo, similar a la inducción de CD25/CD69 como se mostró antes, no indujo una expansión de las células T naive. En presencia de CD28 soluble, sin embargo, fue detectable una expansión de 2-6 veces pero solamente a la dosis ensayada más alta de CD28 (10000 ng/ml). En contraste con esto, CD28 conjugado con la nanomatriz indujo un grado similar de expansión ya a una concentración 1000 veces más baja (10 ng/ml). Estos datos muestran nuevamente el fuerte reticulamiento y la capacidad de activación de células T de la nanomatriz versus anticuerpos solubles, lo cual explica por qué las nanomatrices conjugadas con CD3/CD28 en contraste con anticuerpos solubles pueden usarse para activar y expandir incluso células E humanas naive in vitro.

40 Ejemplo 8: Nanomatrices pueden usarse para activar células T para introducción de genes de TCR mediante transducción viral

Una aplicación importante para activar y expandir células T y en particular subconjuntos de células purificadas es su manipulación genética, por ejemplo para introducir un determinado receptor de antígeno con especificidad para antígenos de tumor. Se han usado nanomatrices para activar células T naive purificadas (TN, CD62L+ CD45RA+), de memoria central (TCM, CD62L+CD45RA-) y efectoras (TEM, CD62L-CD45RA) y transducidas usando un vector retroviral que expresa un TCR específico para MART-1, un antígeno de tumor. Para ensayar la frecuencia relativa de expresión transgénica en estos subconjuntos de células T, se realizó un tinte de tetramero clase I de péptido MHC. Todos los subconjuntos de células T se traducen eficientemente (>50%) independientemente de las condiciones estimulantes que se han ensayado (FIG.7). También se comparó la expansión in vitro de las células T transducidas. Tal como se muestra en la FIG 8, después de 10 días no se observaron diferencias con respecto a la expansión de tres subconjuntos en todas las condiciones. Todos los regímenes de activación para los subconjuntos aislados de células T fueron iguales o mejores que la estimulación "estándar" de PBMC total con CD3 soluble (todos los valores se normalizaron para este estándar para permitir una mejor comparación entre diferentes donantes). Se observó una tendencia (no significativa estadísticamente) de una mejor expansión cuando los subconjuntos de células T se estimulan con MACSiBeads o nanomatrices si se comparan con  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28 recubiertos. Se siguió investigando la actividad funcional de TCR MART-1 introducido y el estatus de diferenciación de las células transducidas mirando a los marcadores de superficie y la producción de citocina después de la re-estimulación con una línea celular de tumor MART-1+HLA-A2+. Tal como se muestra en la FIG 9, las células estimuladas con nanomatriz y MACSiBead T<sub>CM</sub> y T<sub>N</sub> parecen tener un expresión superior de CD62L y CCR7, dos moléculas que facilitan la migración de las células T a los nódulos linfáticos periféricos. Esta capacidad se considera benéfica para promover persistencia a largo plazo y actividad funcional de

- células T transferidas in vivo y por lo tanto se piensa que incrementan la eficacia terapéutica. El porcentaje de células IFN $\gamma$ <sup>+</sup> reactivas con MART-1 tiende a ser más alto en subconjuntos de células T T<sub>CM</sub> y T<sub>EM</sub> en comparación con T<sub>N</sub> en todas las condiciones estimulantes, pero esto no era significativo estadísticamente (FIG 10 panel superior). Al concentrarse en la producción de IL-2 (FIG 10 panel central) se observó que un porcentaje superior de células TN producen IL-2 cuando han sido estimuladas con MACSiBeads/nanomatrices al compararse con la estimulación de  $\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28 recubiertos. Lo mismo es cierto para células que producen TNF $\alpha$  detectadas en un subconjunto de TN cuando se estimulan con MACSiBeads (FIG 10 panel inferior). Estos resultados indican que las células de células derivadas de T<sub>N</sub> estimuladas con partículas esféricas mostraron diferenciación celular efectora disminuida, lo cual sugiere menos progreso hacia la diferenciación terminal.
- 5
- 10 Tomados juntos, los resultados indican que las nanomatrices de CD3/CD28 pueden usarse para activar y trasducir eficientemente subconjuntos de células T purificadas para generar trasplantes plenamente funcionales de células T, por ejemplo para terapia tumoral.

**REIVINDICACIONES**

1. El uso de una nanomatriz para estimulación policlonal in-vitro de células T, y la nanomatriz comprende
- 5 a) una matriz de cadenas poliméricas móviles en cuyo caso dicha matriz se caracteriza por una superficie no sólida, y
- b) adheridos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles uno o más agentes estimulantes que proporcionan señales de activación a las células T;
- en cuyo caso la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500.
2. Un método in vitro para estimulación policlonal de células T y el método comprende poner en contacto una población de células T con una nanomatriz, y la nanomatriz comprende
- 10 a) una matriz de cadenas poliméricas móviles en cuyo caso dicha matriz se caracteriza por una superficie no sólida, y
- b) adheridos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles uno o más agentes estimulantes que proporcionan señales de activación de las células T, por lo cual se activan y se inducen las células T para que proliferen;
- en cuyo caso la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual al menos un primero y un segundo agentes estimulantes se adhieren a la misma matriz de cadenas poliméricas móviles.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual al menos un primero y un segundo agentes estimulantes se adhieren a matrices separadas de cadenas poliméricas móviles.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual la proporción de nanomatrices a células es superior a 500:1 lo que permite el ajuste fino de estimulación de células T.
- 20 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el cual un agente estimulante es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento del mismo.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el segundo agente estimulante es un anticuerpo anti-CD28.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 to 7, en el cual la matriz de cadenas poliméricas móviles consiste en un polímero de dextrano.
- 25 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el cual la nanomatriz tiene nanocristales magnéticos, paramagnéticos o superparamagnéticos, incrustados en la matriz de cadenas poliméricas móviles.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el cual el agente estimulante se adhiere a alta densidad con más de 25 µg por mg de nanomatriz.
- 30 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el cual las células T estimuladas son células Treg.
12. Un método para estimulación policlonal de células T en un sistema cerrado de cultivo de células, y el método comprende poner en contacto un cultivo de células que comprende una población de células T dentro de dicho sistema cerrado de cultivo de células con una dosificación de nanomatriz, y nanomatriz comprende
- 35 a) una matriz de cadenas poliméricas móviles en cuyo caso dicha matriz se caracteriza por una superficie no sólida; y
- b) adheridos a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles uno o más agentes estimulantes que proporcionan señales de activación a las células T;
- en cuyo caso la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500,
- y en cuyo caso dicha dosificación de nanomatriz se aplica de modo estéril a dicho sistema cerrado de cultivo de células y dicha dosificación depende del volumen del cultivo de células en dicho sistema cerrado de cultivo de células.
- 40 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el cual dicho volumen del cultivo celular puede determinarse por medio de un sistema de balanza o de cámara sin afectar la barrera de esterilidad.
14. Un método de acuerdo con la reivindicacións 12 y 13, en el cual la determinación y aplicación de dicha dosificación se realizan automáticamente.

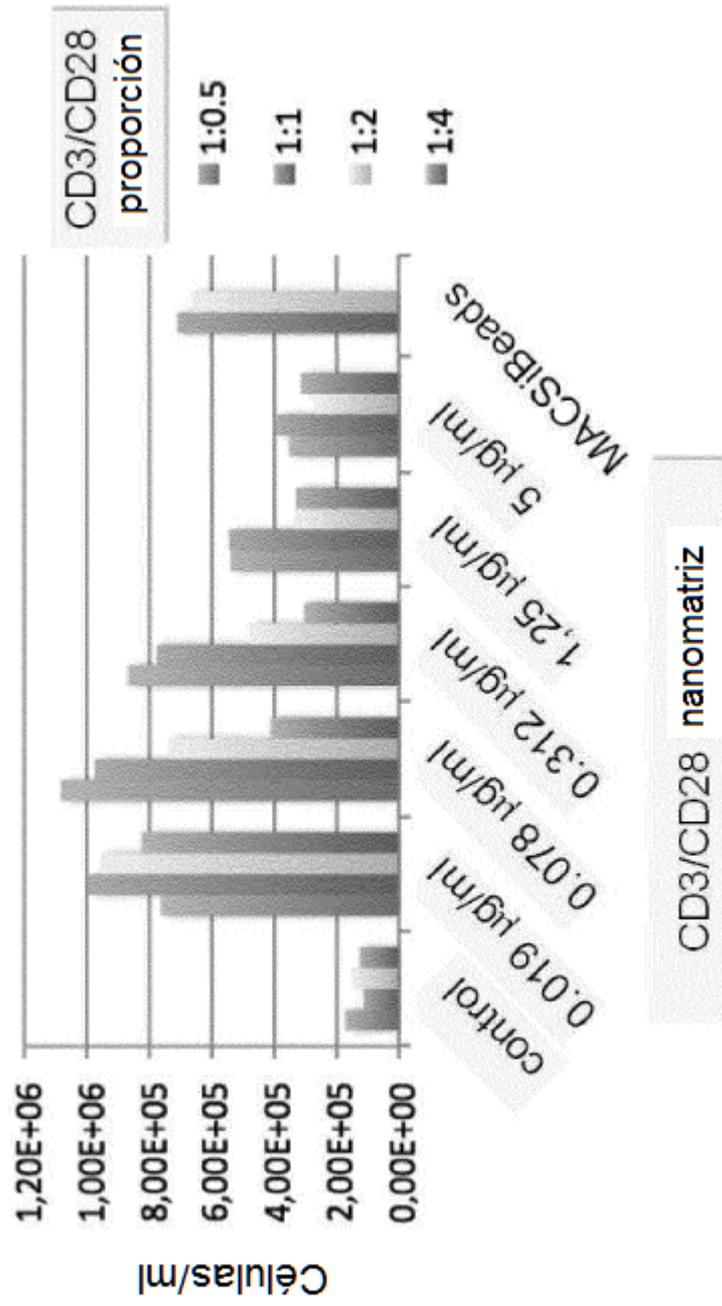


FIG 1

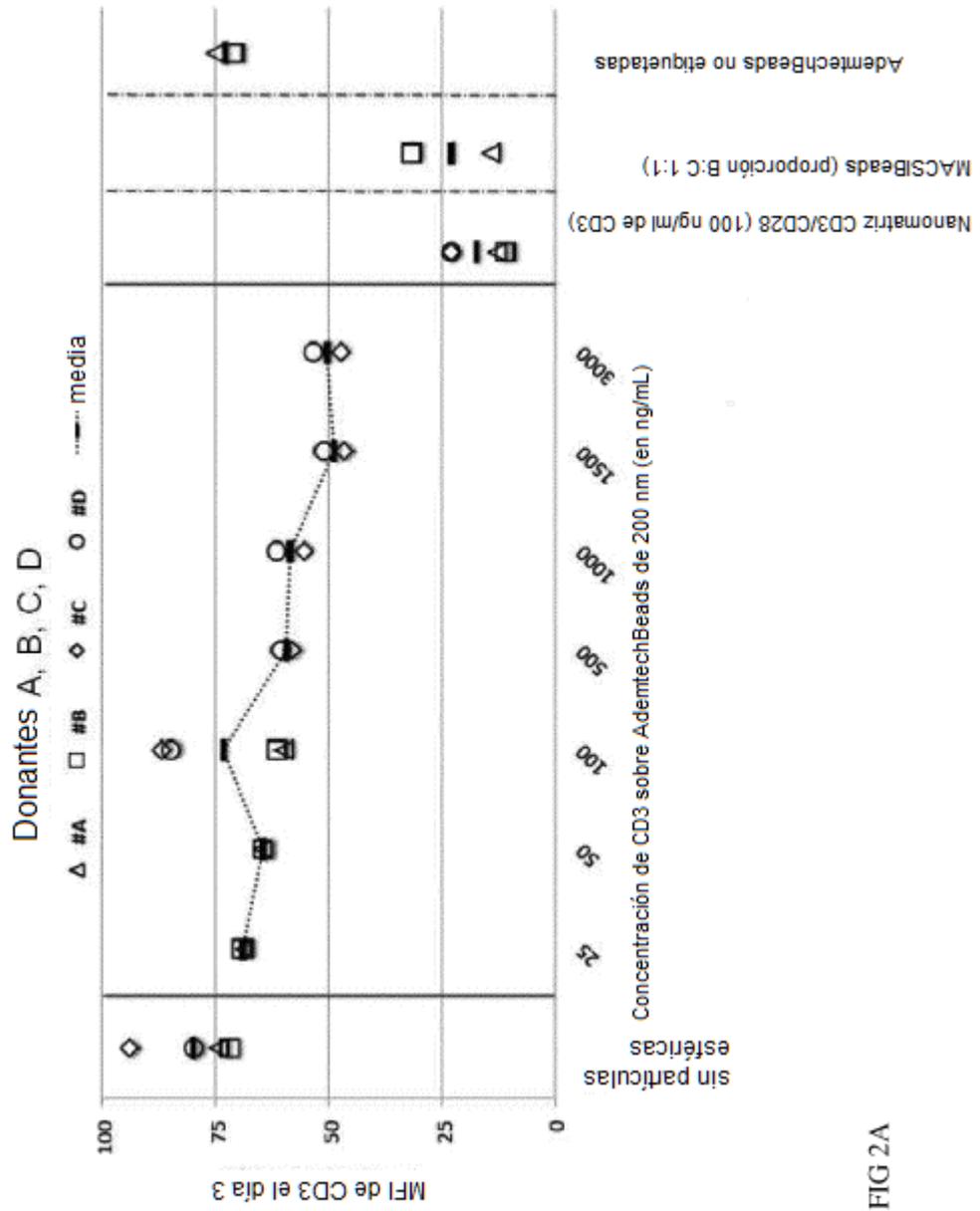


FIG 2A

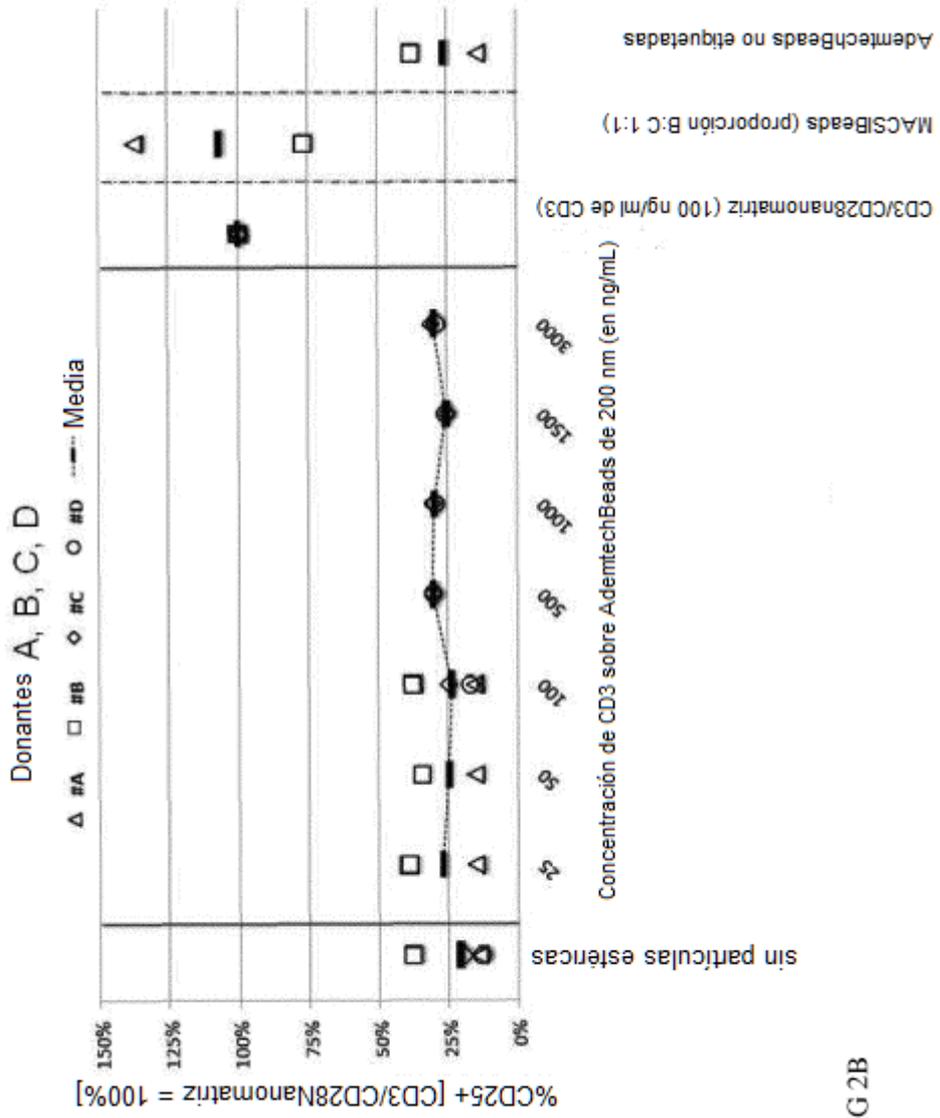


FIG 2B

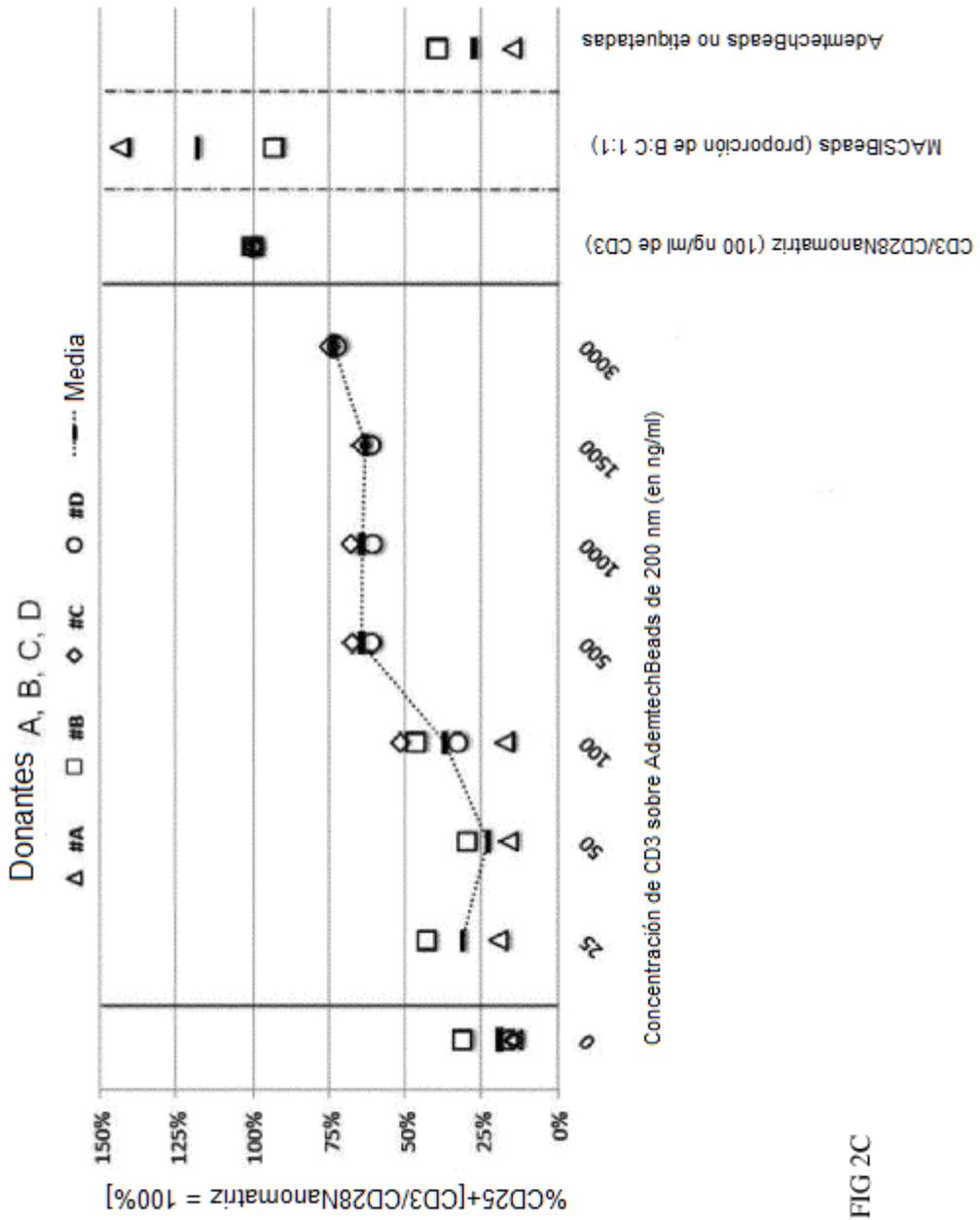


FIG 2C

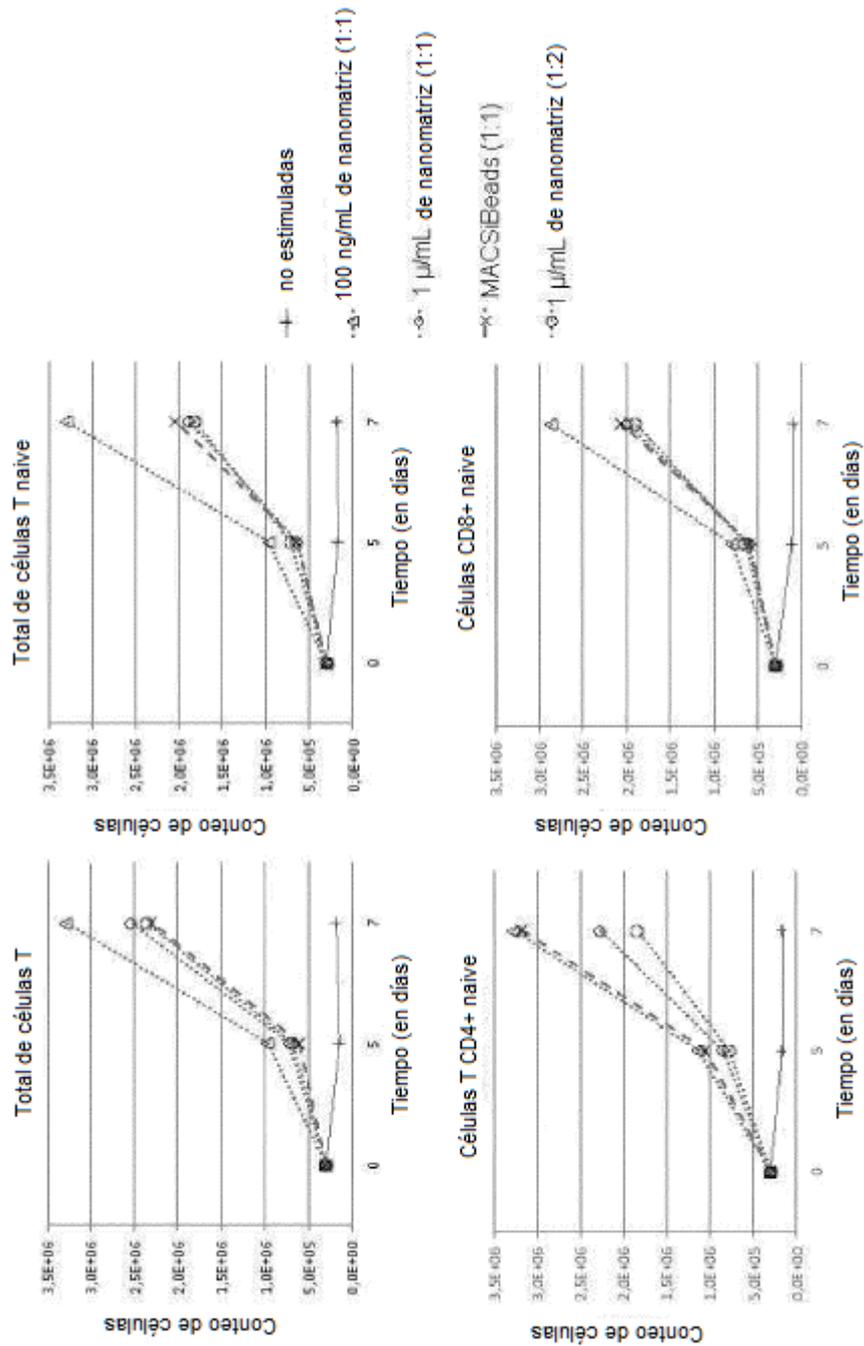


FIG 3

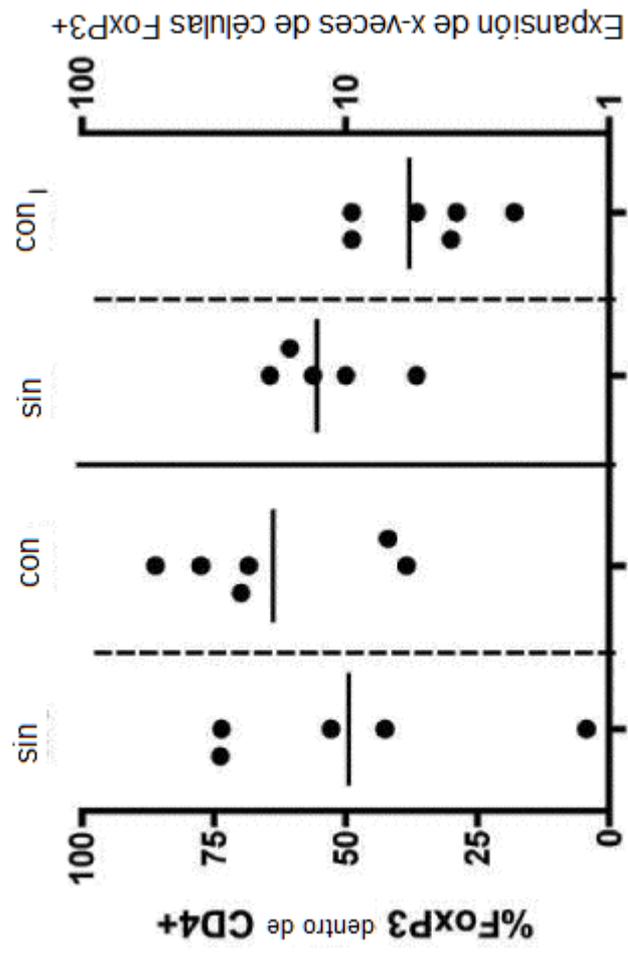


FIG 4

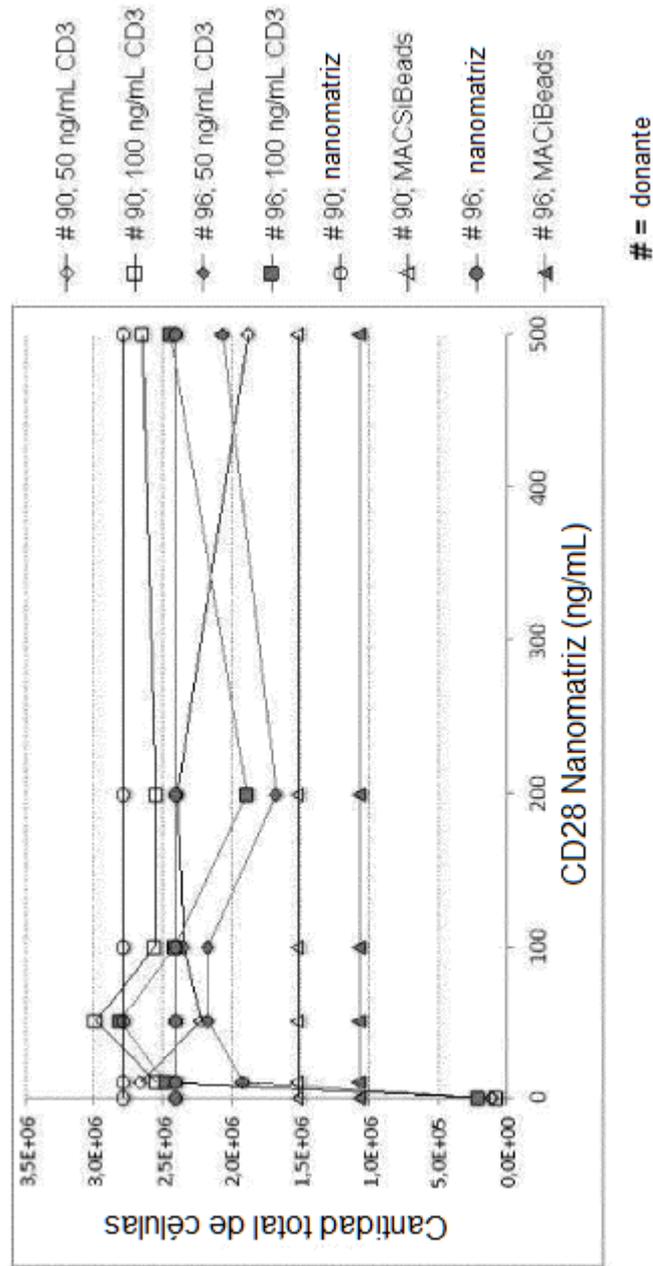


FIG 5A

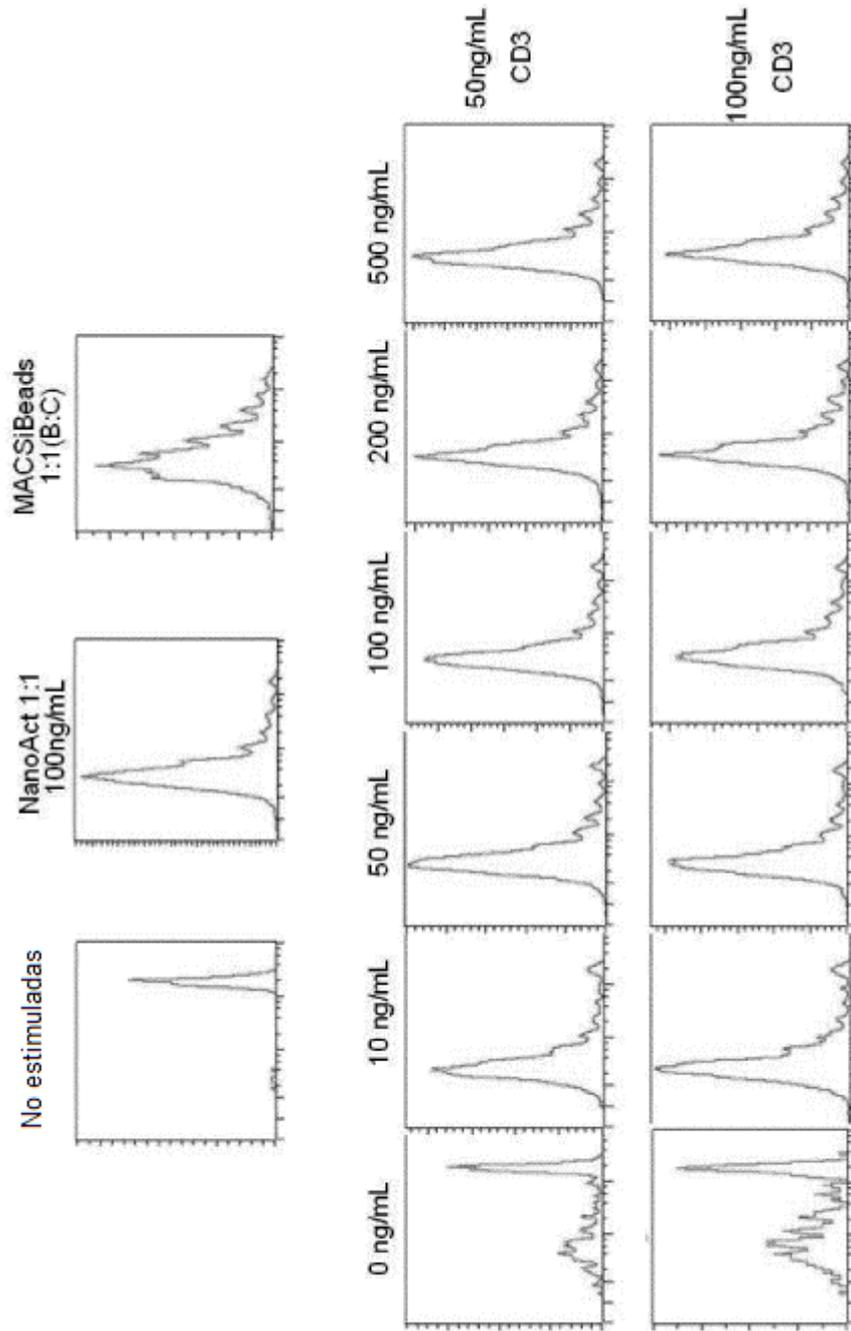


FIG 5B

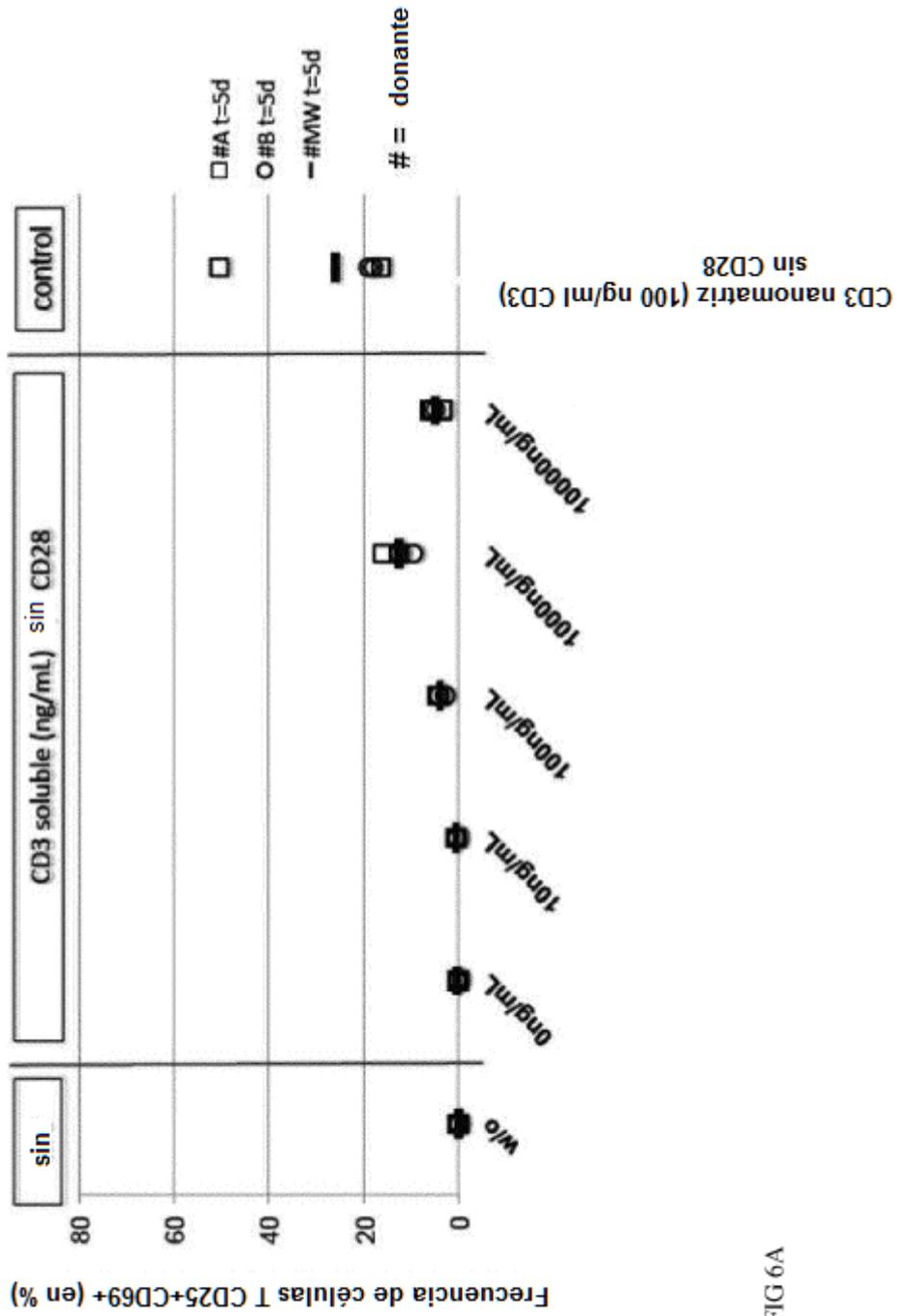


FIG 6A

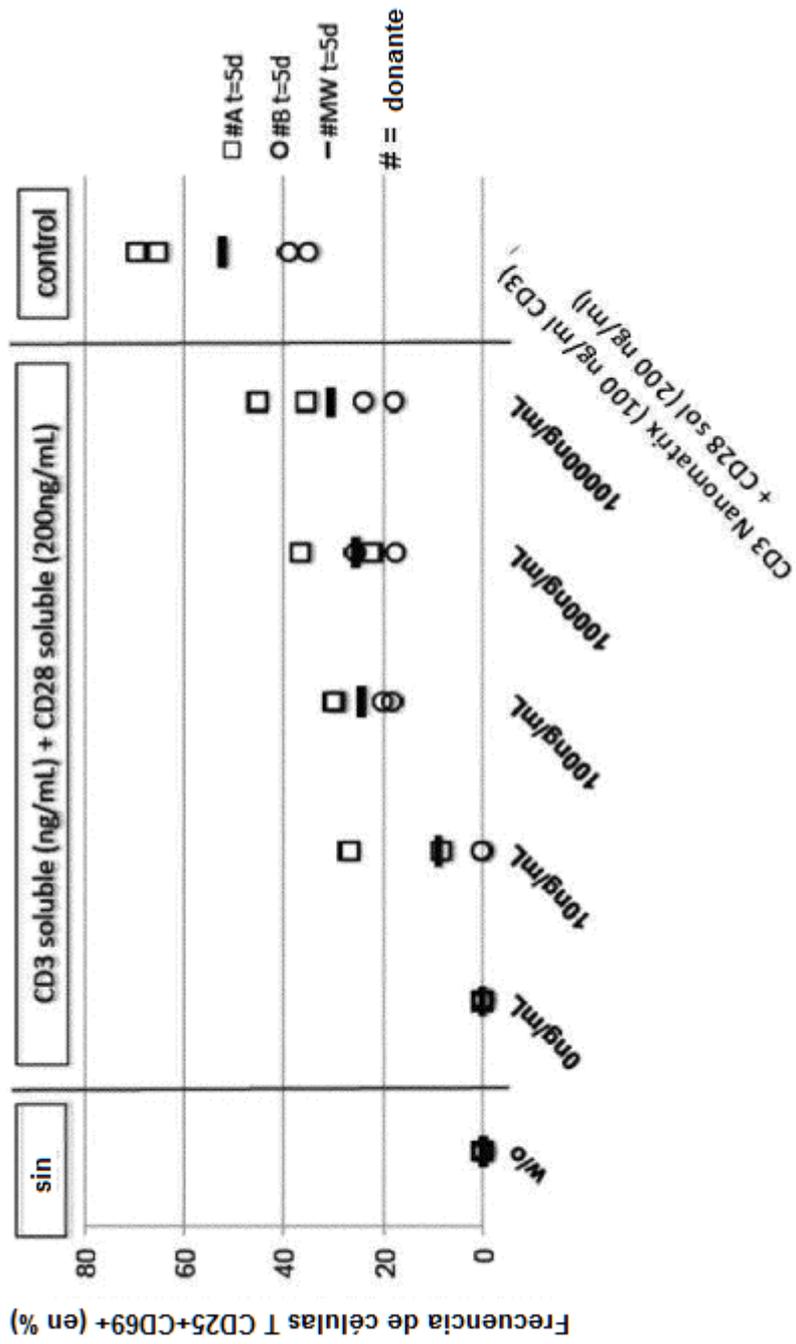


FIG 6B

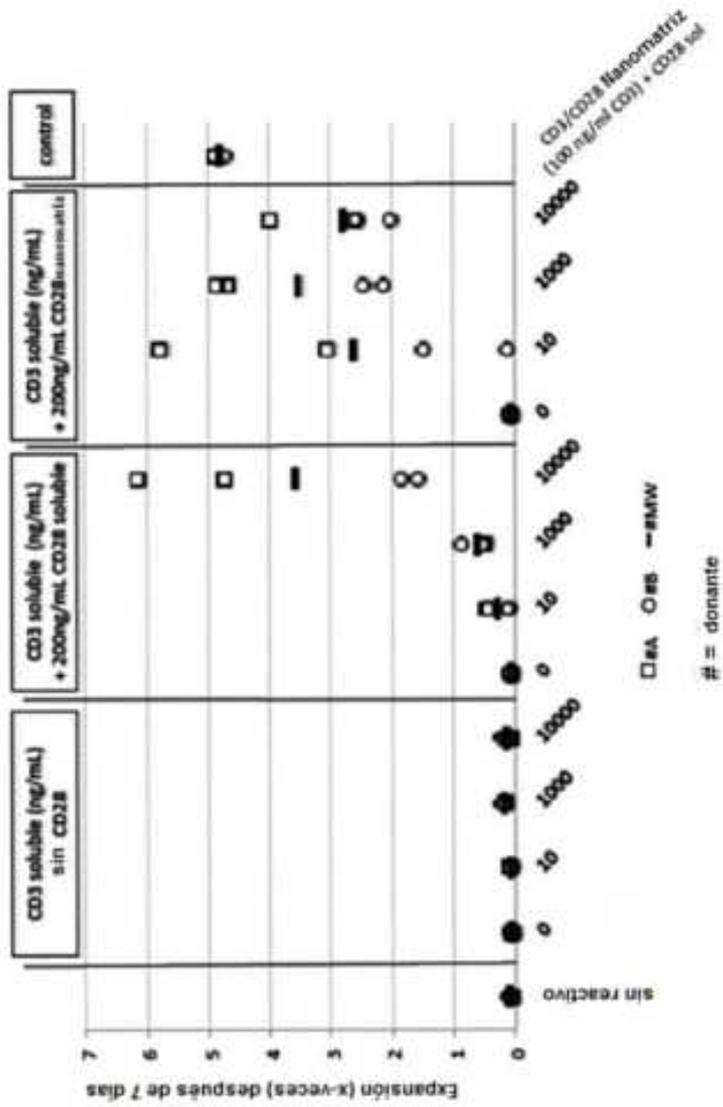


FIG 6C

**Eficiencia de transducción**  
(% CD8<sup>+</sup>MART-1tet<sup>+</sup> entre células CD8<sup>+</sup>)

	$\alpha$ CD3+ $\alpha$ CD28	MACSiBeads	Nanomatriz	Soluble $\alpha$ CD3
T <sub>N</sub>	90.2 (84.4 - 98)	45.9 ( 28.6 - 65.7)	58.5 (35.6 - 80.3)	---
T <sub>CM</sub>	91.7 (86 - 96.4)	86 (74.6 - 94.6)	81.7 (63.1 - 91.3)	---
T <sub>EM</sub>	85.3 (69.7 - 91.8)	82.5 (76.4 - 90.5)	90.2 (68.8 - 95.1)	---
PBMC	---	---	---	82.2 (72.8 - 91.8)

FIG 7

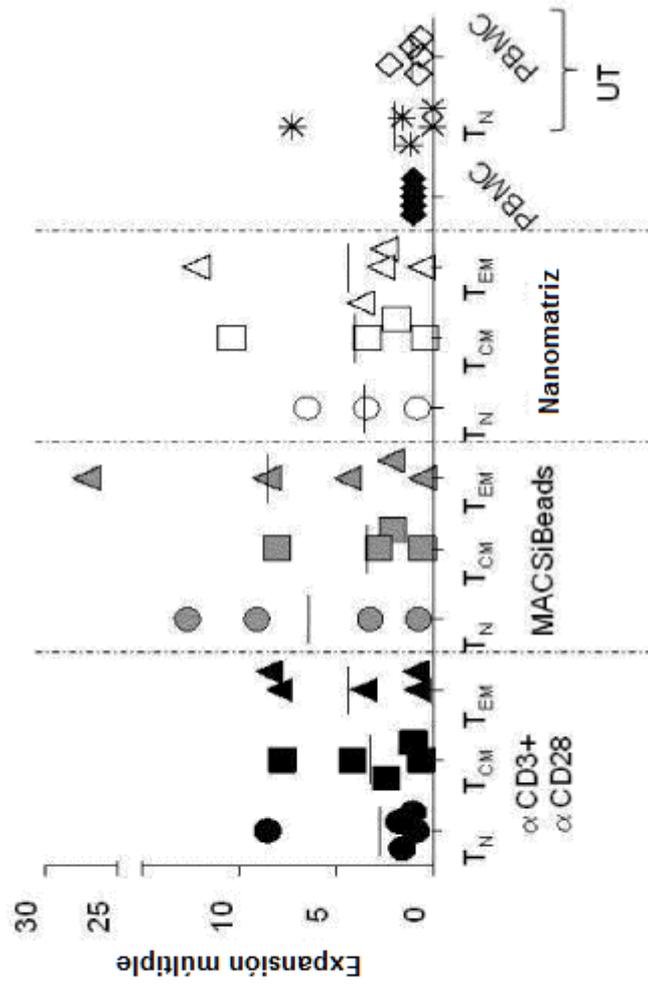


FIG 8

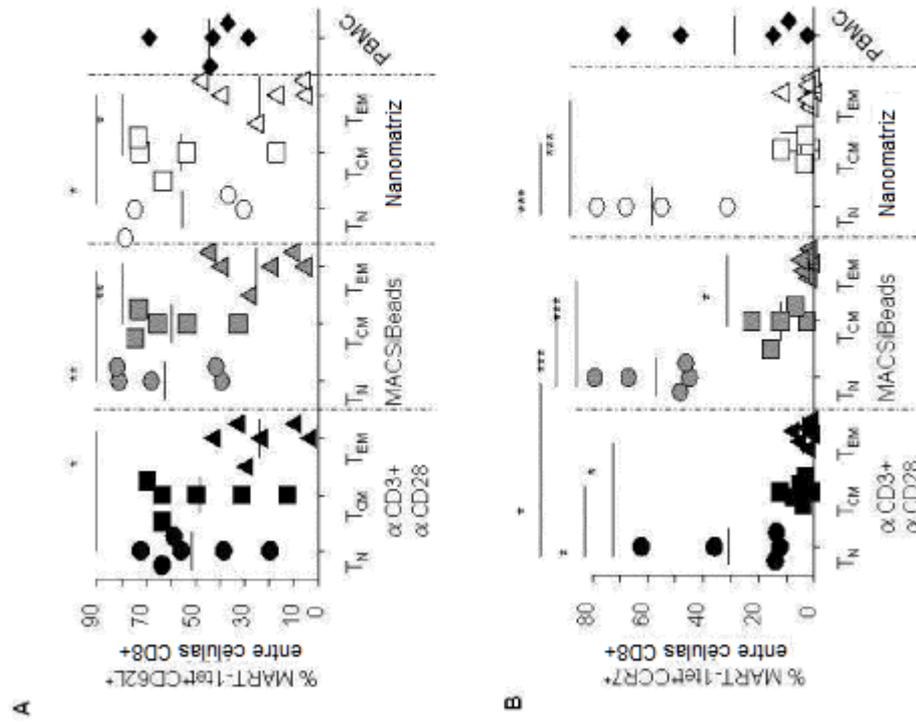


FIG 9A-B

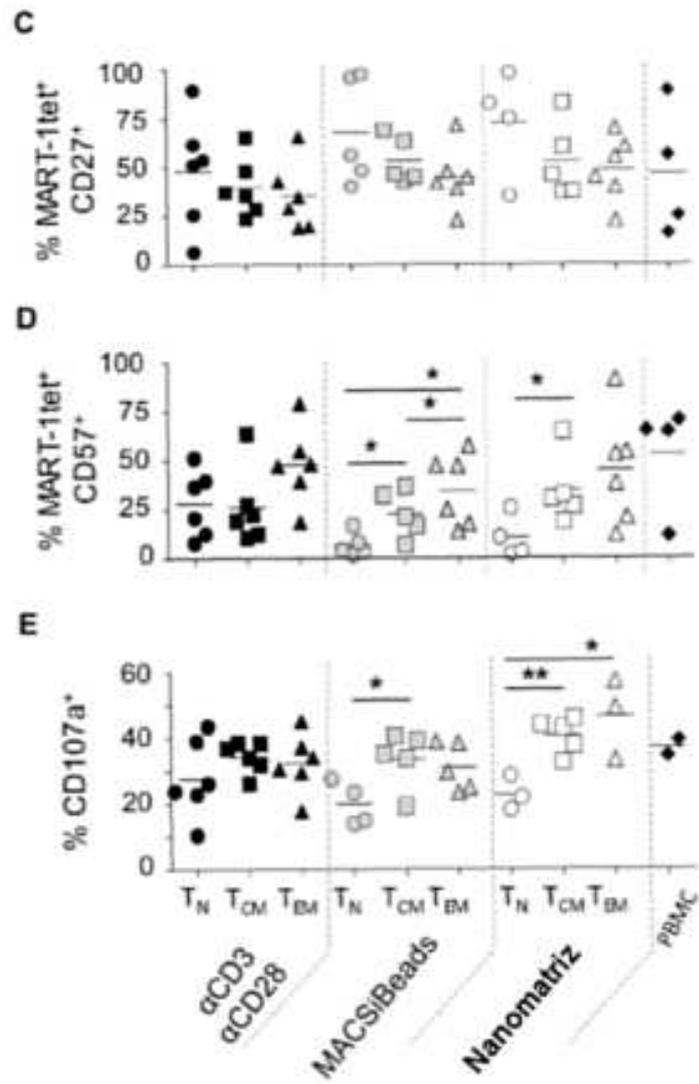


FIG 9C-E

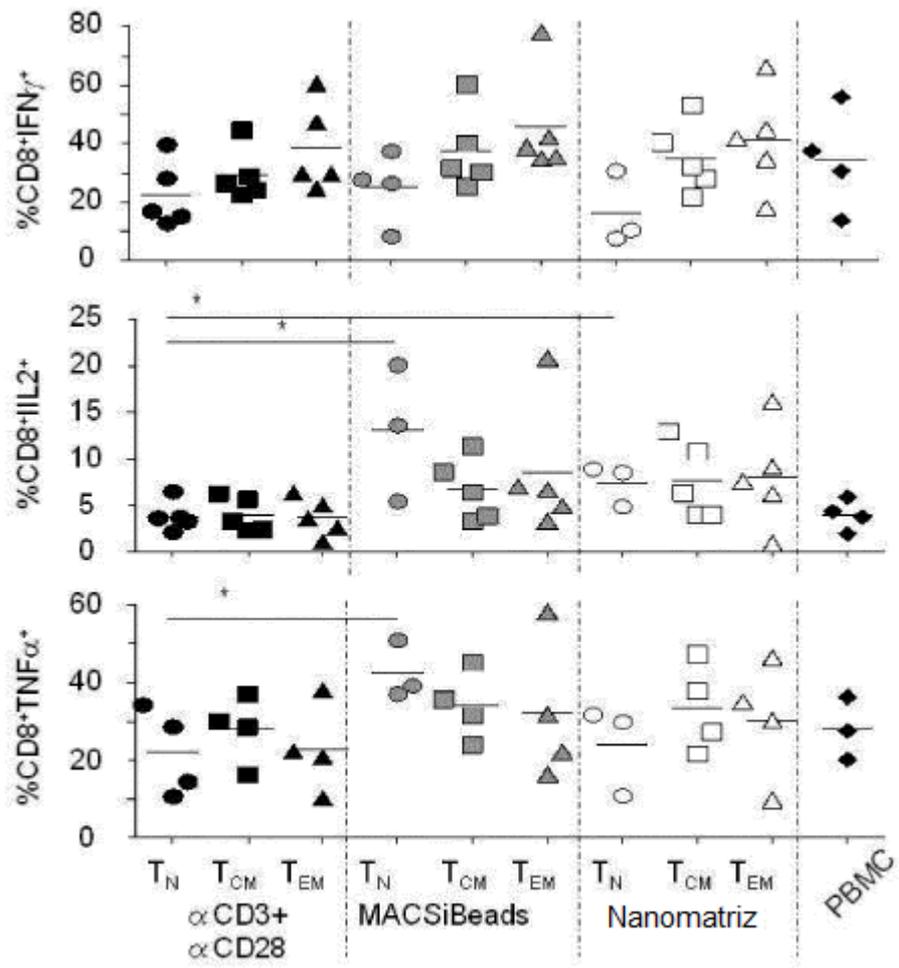


FIG 10