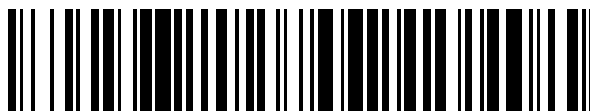


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 813**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17	(2015.01)	A61K 35/12	(2015.01)
A61K 35/28	(2015.01)	A61K 35/407	(2015.01)
A61K 35/34	(2015.01)		
A61K 35/39	(2015.01)		
A61K 35/42	(2015.01)		
C12N 5/0783	(2010.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		
A61K 35/22	(2015.01)		
A61K 35/26	(2015.01)		
A61K 35/36	(2015.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2012 PCT/IL2012/050354**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13035099**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2012 E 12769743 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2753351**

54 Título: **Linfocitos T de memoria central antiterceros, métodos para producirlos y uso de los mismos en un trasplante y el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

08.09.2011 US 201161532172 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 640 813 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

Linfocitos T de memoria central antiterceros, métodos para producirlos y uso de los mismos en un trasplante y el tratamiento de enfermedades

5

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células antiterceros reactivas para injerto contra leucemia y/o inductoras de tolerancia que comprenden el fenotipo de linfocitos T de memoria central y, más particularmente, pero no exclusivamente, a métodos para generarlos y al uso de los mismos en el trasplante y en el tratamiento de enfermedad.

10

El trasplante de médula ósea (MO) ofrece un tratamiento curativo para muchos pacientes con tumores malignos hematológicos y otros trastornos hematológicos. Sin embargo, el injerto de MO contiene células T donantes que responden a los antígenos del hospedador (Ag) y provocan enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) multisistémica. A principios de los años 80 se demostró el trasplante de médula ósea (TMO), sin el efecto deletéreo de GVHD, en situaciones haploidénticas (tres loci de HLA desapareados), en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). El problema de la GVHD, que es casi uniformemente letal en dichas situaciones, se evitó completamente por agotamiento de células T.

15

20

Sin embargo, en pacientes con leucemia, el resultado clínico de MO con agotamiento de células T fue decepcionante, ya que el beneficio de la prevención de la GVHD se compensó por un aumento notable de la tasa de rechazo de injertos. Se mostró que el rechazo estaba mediado por células T procedentes del hospedador resistentes a radioquimioterapia [Reisner *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. (1986) 83: 4012-4015]. Un modo de superar este problema es realizar TMO después de acondicionamiento supraletal e inactivación funcional de células T hospedadoras usando fármacos inmunosupresores. No obstante, esta estrategia está dificultada por infecciones oportunistas debido a la reconstitución inmunitaria lenta y considerables toxicidades de los inmunosupresores.

25

Aunque en pacientes con leucemia de alto riesgo dicha mortalidad relacionada con el trasplante puede ser aceptable, sería intolerable si se aplicara a pacientes con una larga esperanza de vida. Por lo tanto, el uso de acondicionamiento de intensidad reducida, con ablación inmunitaria menos grave, para permitir la realización de injertos de MO con agotamiento de T (MOAT), que se asocia con riesgo reducido para GVHD, está justificado. El establecimiento de quimerismo de tipo donante en dicho acondicionamiento reducido representa un objetivo más deseable en la biología de trasplantes, ya que se asocia en general con tolerancia duradera a células o tejidos del donante original. Sin embargo, los niveles notables de células inmunitarias del hospedador que sobreviven a los regímenes preparatorios suaves, representan una barrera difícil para el injerto de células donantes.

30

35

Un enfoque para superar el rechazo de MOAT alogénica hizo uso de dosis celulares grandes. Se demostró en primer lugar en modelos de roedores que una "megadosis" de trasplante de MOAT puede superar el rechazo de injerto mediado por células T [Lapidot *et al.*, Blood (1989) 73: 2025-2032; Bachar-Lustig *et al.*, Nat Med. (1995) 1: 1268-1273; Uharek *et al.*, Blood (1992) 79: 1612-1621]. Sin embargo, un aumento significativo en el inóculo de MO ha sido difícil de conseguir en seres humanos. Para superar este problema se ha usado factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), que facilita la movilización de células madre hematopoyéticas (HSC, células CD34+ en seres humanos) de la MO, para aumentar la producción de HSC recogidas de la sangre y se complementó la MOAT convencional con HSC con agotamiento de células T [Aversa *et al.*, N Engl J Med. (1998) 339: 1186-1193; Aversa *et al.*, J Clin Oncol. (2005) 23: 3447-3454; Reisner y Martelli, Immunol Today (1999) 20: 343-347; Handgretinger *et al.*, Bone Marrow Transplant. (2001) 27: 777-783].

40

45

Los trasplantes de "megadosis" de CD34 plantearon dudas interesantes acerca de cómo estas células superan la barrera presentada por precursores de linfocitos T citotóxicos de los hospedadores (CTL-p). Esta duda no recibió respuesta, en parte, por el hallazgo de que las células dentro de la fracción CD34 están dotadas de una potente actividad de veto [Gur *et al.*, Blood (2005) 105: 2585-2593; Gur *et al.*, Blood (2002) 99: 4174-4181; Rachamim *et al.*, Transplantation (1998) 65: 1386-1393]. También se ha mostrado que otros tipos celulares median en la actividad de veto incluyendo linfocitos T (por ejemplo CTL CD8+), células citolíticas naturales y células dendríticas. La comparación directa de la reactividad de veto de diversos tipos celulares reveló que los CTL comprenden el efecto de veto más fuerte [Reich-Zeliger *et al.*, J Immunol. (2004) 173: 6654-6659].

50

55

Un enfoque desarrollado para generar CTL de veto sin reactividad de GVH se describió por Reisner y colaboradores, en el que se estimularon CTL contra terceros estimulantes en ausencia de IL-2 exógena. Este enfoque se basó en la observación de que solamente los CTLp activados eran capaces de sobrevivir a la privación de IL-2 en el cultivo primario. Se ha mostrado *in vitro* e *in vivo* que este método agota la reactividad de GVH de los CTL de veto antiterceros [publicación de PCT n.º WO 2001/049243, Bachar-Lustig *et al.*, Blood. 2003;102: 1943-1950; Aviner *et al.*, Hum Immunol. (2005) 66: 644-652]. La introducción de estos CTL de veto antiterceros en un receptor (junto con un trasplante) evitó el rechazo de injerto sin inducir GVHD (publicación de PCT n.º WO 2001/049243).

60

65

Se han contemplado diversos enfoques para trasplante de injertos sin rechazo de injertos y/o enfermedad de injerto contra hospedador, algunos de los cuales se resumen a continuación.

5 La publicación de PCT n.º WO 2007/023491 desvela el uso de células tolerogénicas para reducir o prevenir el rechazo de injertos de un injerto no singénico en un sujeto. Las células tolerogénicas desveladas (por ejemplo células CD4+CD25+) pueden proceder de cualquier donante que no sea singénico tanto para el sujeto como para el injerto ("terceras" células tolerogénicas). El injerto (por ejemplo médula ósea) puede proceder de cualquier donante de injerto que sea alogénico o xenogénico con el sujeto.

10 La publicación de PCT de patente n.º WO 2002/102971 desvela el uso de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) cultivadas que comprenden actividad de veto potenciada para inducir tolerancia a un trasplante trasplantado de un donante a un receptor. Las células tolerogénicas desveladas expresan preferentemente CD33 y se administran antes de, simultáneamente con o después del trasplante (por ejemplo trasplante de células u órgano).

15 La publicación de PCT de patente n.º WO 2002/043651 desvela el uso de una población no inductora de GVHD de células efectoras inmunitarias para tratamiento de enfermedad. Para llegar a una población no inductora de GVHD de células efectoras inmunitarias, se cocultiva una primera población de células (por ejemplo linfocitos T) con una segunda población de células que no es singénica con el sujeto y no es singénica con la primera población de células (por ejemplo linfocitos B infectados por VEB) en condiciones que incluyen privación de IL-2 seguida de
20 complementación con IL-2. Las células efectoras inmunitarias resultantes pueden usarse para tratar enfermedades tales como enfermedades malignas, enfermedades víricas y enfermedades autoinmunitarias.

25 La patente de Estados Unidos n.º 6.759.035 desvela métodos para inhibir el rechazo de injertos e inducir tolerancia de células T en un receptor de trasplante de órganos sólido. Los métodos desvelados comprenden retirar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante y un receptor, cultivar las células donantes y receptoras juntas en presencia de un compuesto que induce actividad supresora de células T (por ejemplo TGF-β, IL-15 e IL-2) y administrar las células T supresoras receptoras al receptor junto con el trasplante para evitar que las células T del receptor destruyan células donantes, induciendo de este modo tolerancia y supervivencia a largo plazo del trasplante.

30 La patente de Estados Unidos n.º 6.803.036 desvela métodos para tratar células donantes para aliviar la enfermedad de injerto contra hospedador en un paciente receptor. Los métodos desvelados comprenden retirar PBMC de un donante y tratar las células con una composición supresora (por ejemplo IL-10, IL-2, IL-4, IL-15 y TGF-β) durante un tiempo suficiente para inducir tolerancia a células T. Las células se introducen después en un paciente receptor. Las
35 células tratadas pueden añadirse a células madre donantes antes de la introducción en el paciente.

La publicación de PCT n.º WO 2010/049935 desveló una población aislada de células que comprenden células antiterceros no inductoras de GVHD que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células células inductoras de tolerancia y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después del trasplante.

40 Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método para generar una población aislada de células que comprenden células antiterceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células células inductoras de tolerancia y/o dotadas de actividad antienfermedad, y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de trasplante, comprendiendo el método: (a) poner en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un tercer antígeno o terceros antígenos en presencia de IL-21 para permitir el enriquecimiento de células reactivas a antígeno; y (b) cultivar las células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), generando de este modo la población aislada de células.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método para generar una población aislada de células que comprenden células antiterceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células células inductoras de tolerancia y/o dotadas con actividad de injerto contra leucemia (GVL) y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de trasplante, comprendiendo el método: (a) tratar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no adherentes con un agente capaz de agotar células CD4+ y/o CD56+ para obtener células T CD8+; (b) poner en contacto las células T CD8+ con terceras células dendríticas en presencia de IL-21 durante 12 horas hasta 5 días para permitir el enriquecimiento de células reactivas a antígeno; (c) cultivar las células resultantes de la etapa (b) con las terceras células dendríticas en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 durante 12 horas hasta 3 días; y (d) cultivar las células resultantes de la etapa (c) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos durante 5-20 días para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), generando de este modo la población aislada de células.

65

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método para generar una población aislada de células que comprenden células antiterceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), estando las células dotadas de actividad antienfermedad, y siendo las células capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después del trasplante, comprendiendo el método: (a) tratar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no adherentes con un agente capaz de agotar células CD4+ y/o CD56+ para obtener células T CD8+; (b) poner en contacto las células T CD8+ con células dendríticas no singénicas en presencia de IL-21 durante 12 horas hasta 5 días para permitir el enriquecimiento de células reactivas a antígeno; (c) cultivar las células resultantes de la etapa (b) con las células dendríticas no singénicas en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 durante 12 horas hasta 3 días; y (d) cultivar las células resultantes de la etapa (c) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos durante 5-20 días para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), generando de este modo la población aislada de células.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una población aislada de células que comprenden células antiterceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), en las que al menos el 50 % de la población aislada de células son células CD3+CD8+ de las que al menos el 50 % comprenden una identificación CD3+, CD8+, CD62L+, CD45RA-, CD45RO+ y además en las que las células son células inductoras de tolerancia y/o dotadas con actividad antienfermedad, y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después del trasplante.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una población aislada de células que comprenden células antiterceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células células inductoras de tolerancia y/o dotadas de actividad antienfermedad, y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de trasplante, generados de acuerdo con los presentes métodos.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método para tratar una enfermedad en un sujeto que lo necesite, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad maligna, una enfermedad vírica y una enfermedad autoinmunitaria, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población aislada de células de la presente invención, tratando de este modo al sujeto.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método para tratar un sujeto que necesite un trasplante celular o tisular, comprendiendo el método: (a) realizar un trasplante celular o tisular al sujeto; y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población aislada de células de la presente invención, tratando de este modo al sujeto.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método para tratar un sujeto que necesite un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras, comprendiendo el método: (a) trasplantar células hematopoyéticas inmaduras al sujeto; y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población aislada de células de la presente invención, tratando de este modo al sujeto.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además agotar células no adherentes de las PBMC antes de la etapa (a).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además agotar células CD4+ y/o CD56+ de las PBMC antes de la etapa (a).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además seleccionar células CD45RA+ y/o CD45RO de las PBMC antes de la etapa (a).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las PBMC comprenden células T CD8+.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además cultivar las células resultantes de la etapa (a) con un tercer antígeno o antígenos en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 después de la etapa (a) y antes de la etapa (b).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el tercer antígeno o los terceros antígenos comprenden células dendríticas.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células dendríticas son células dendríticas irradiadas.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el tercer antígeno o los terceros antígenos se seleccionan del grupo que consiste en terceras células, un antígeno celular, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un extracto proteico, una proteína modificada y un péptido sintético presentado por células presentadoras autólogas, células presentadoras no autólogas o en un vehículo artificial o en células presentadoras de antígenos artificiales.

65

- 5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las terceras células son células estimulantes seleccionadas del grupo que consiste en células purificadas de linfocitos de sangre periférica, bazo o ganglios linfáticos, PBL movilizadas por citocinas, células presentadoras de antígenos (APC) expandidas *in vitro*, células dendríticas expandidas *in vitro* y células presentadoras de antígenos artificiales.
- 10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además seleccionar células CD45RA+ y/o CD45RO- de las PBMC después de la etapa (a) y antes de la etapa (b).
- 15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células T CD8+ comprenden células T CD8+ no tratadas previamente.
- 20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células dendríticas comprenden células dendríticas expandidas *in vitro*.
- 25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células dendríticas comprenden células dendríticas irradiadas.
- 30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el contacto en presencia de IL-21 se efectúa durante 12 horas a 5 días.
- 35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el contacto en presencia de IL-21 se efectúa durante 2-3 días.
- 40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el contacto en presencia de IL-21 se efectúa durante 3 días.
- 45 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además seleccionar células activadas después de la etapa (a) y antes de la etapa (b).
- 50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además seleccionar células activadas después de la etapa (b) y antes de la etapa (c).
- 55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la selección de células activadas se efectúa por selección de células CD137+ y/o células CD25+.
- 60 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la selección de células activadas se efectúa 12-72 horas después del contacto.
- 65 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo con el tercer antígeno o los terceros antígenos en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 se efectúa durante 12 horas a 3 días.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en el ambiente sin antígenos se efectúa durante 5-20 días.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cultivo en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en el ambiente sin antígenos se efectúa durante 7-11 días.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además agotar células alorreactivas después de la etapa (b).
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además agotar células alorreactivas después de la etapa (d).
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agotamiento de células alorreactivas se efectúa por agotamiento de células CD137+ y/o CD25+ después de poner en contacto las células que comprenden el linfocito T de memoria central (Tcm) con células presentadoras de antígenos (APC) hospedadoras.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) son singénicas con respecto a un sujeto.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no son singénicas con respecto a un sujeto.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las PBMC no singénicas son xenogénicas o alogénicas con respecto a un sujeto.

ES 2 640 813 T3

- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las terceras células que tienen un fenotipo de memoria central T comprenden una identificación CD3⁺, CD8⁺, CD62L⁺, CD45RA⁻, CD45RO⁺.
- 5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, al menos el 50 % de la población aislada de células son células CD3+CD8+ de las que al menos el 50 % tienen la identificación.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la enfermedad maligna comprende una leucemia o un linfoma.
- 10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la población aislada de células son singénicas con el sujeto.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la población aislada de células no son singénicas con el sujeto.
- 15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además acondicionar el sujeto en condiciones subletales, letales o supraletales antes del trasplante.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trasplante celular o tisular es singénico con el sujeto.
- 20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trasplante celular o tisular procede de un donante seleccionado del grupo que consiste en un donante alogénico de HLA idéntico, un donante alogénico de HLA no idéntico y un donante xenogénico.
- 25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trasplante celular o tisular comprende células hematopoyéticas inmaduras.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trasplante celular o tisular se selecciona del grupo que consiste en un hígado, un páncreas, un bazo, un riñón, un corazón, un pulmón, una piel, un intestino y un tejido u órgano linfóide/hematopoyético.
- 30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trasplante celular o tisular comprende un cotrasplante de varios órganos.
- 35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cotrasplante comprende el trasplante de células hematopoyéticas inmaduras y un órgano sólido.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células hematopoyéticas inmaduras y el órgano sólido u obtenido del mismo donante.
- 40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células hematopoyéticas inmaduras se trasplantan antes de, simultáneamente con o después del trasplante del órgano sólido.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la población aislada de células se administra antes de, simultáneamente con o después del trasplante celular o tisular.
- 45 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la población aislada de células son singénicas con el sujeto.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la población aislada de células no son singénicas con el sujeto.
- 50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trasplante celular o tisular y la población aislada de células proceden del mismo donante.
- 55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trasplante celular o tisular es singénico con el sujeto y la población aislada de células no son singénicas con el sujeto.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trasplante celular o tisular es singénico con el sujeto y la población aislada de células son singénicas con el sujeto.
- 60 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la población aislada de células se administra antes de, simultáneamente con o después de las células hematopoyéticas inmaduras.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células hematopoyéticas inmaduras y la población aislada de células proceden del mismo donante.
- 65 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el donante no es singénico con el sujeto.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células hematopoyéticas inmaduras y la población aislada de células proceden del sujeto.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además acondicionar al sujeto en condiciones subletales, letales o supraletales antes del trasplante.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el sujeto es un sujeto humano.

10 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de realizaciones de la invención, se describen posteriormente métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, tendrá prevalencia la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

20 Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, solamente como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son ejemplos y para fines de análisis ilustrativo de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la materia cómo pueden practicarse realizaciones de la invención.

25 En los dibujos:

30 Las Figuras 1A-B son diagramas esquemáticos que representan situaciones autólogas (Figura 1A) y alogénicas (Figura 1B) humanas. Debe observarse que las dos situaciones difieren entre sí en el origen del donante de médula ósea (MO) (hospedador frente a alogénico), los agentes de respuesta (hospedadores frente a alogénicos) y estimulantes (cualquier donante alogénico frente a tercero no reactivo de forma cruzada con MHC del hospedador) que están implicados en la generación de Tcm.

35 Las Figuras 2A-B son diagramas esquemáticos que representan situaciones singénica (Figura 2A) y alogénica (Figura 2B) de ratón. Debe observarse que las dos situaciones difieren entre sí en el origen del donante de MO (singénico o F1 frente a alogénico), los agentes de respuesta (singénicos o F1 frente a alogénicos) y estimulantes (alogénicos frente a terceros) que están implicados en la generación de Tcm.

Las Figuras 3A-B son diagramas esquemáticos que representan el protocolo humano autólogo para la generación de Tcm (Figura 3A) en comparación con el protocolo de ratón singénico (Figura 3B).

40 Las Figuras 4A-C representan la cinética de generación de memoria central antiterceros ("experimentos de control de referencia"). Las células T CD8 sin tratamiento previo se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en un medio que contenía IL-21 durante 3 días. A continuación, las células no recibieron ninguna activación adicional y se expandieron en un medio que contenía IL-7 e IL-15 hasta el día 12,5. Los días 7,5, 10,5 y 12,5, las células se evaluaron con respecto al fenotipo (expresión de marcador de superficie) (Figura 4A) y porcentaje de Tcm (CD62L+CD45RO+) de células T CD8 usando análisis de FACS (Figura 4B) y con respecto a números de células por exclusión de azul de tripano (Figura 4C). Para cada punto temporal los datos representan el promedio \pm ET de n experimentos independientes.

45 Las Figuras 5A-C representan un experimento típico que demuestra el papel de la sensibilización con CD alogénicas. Debe observarse que IL-21 solo o IL-7 más IL-15 sin sensibilización de CD no induce fenotipo de memoria central en células T CD8 sin tratamiento previo y apenas apoya su expansión. La Figura 5A ilustra células T CD8 sin tratamiento previo que se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en un medio que contenía IL-21 durante 3 días. A continuación, las células no recibieron más activación y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 13 ("grupo de control de referencia" = d(0-3) IL21+DC d(3-13)IL7+IL15); las Figuras 5B-C ilustran células T CD8 T sin tratamiento previo que se cultivaron con IL-21 (Figura 5B) o con una combinación de IL-7 e IL-15 (Figura 5C) en ausencia de estimulación hasta el día 10 o el día 13, respectivamente.

50 Las Figuras 6A-B representan el papel de la sensibilización con CD alogénicas demostrado por la influencia relativa promedio en el nivel de Tcm y el factor de expansión en comparación con el grupo de control de referencia. Se estimularon células T CD8 sin tratamiento previo con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en un medio que contenía IL-21 durante 3 días. A continuación, las células no recibieron más activación y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 13 ("grupo de control de referencia" = d(0-3) IL21+DC d(3-13)IL7+IL15). Como alternativa, se cultivaron células T CD8 sin tratamiento previo con IL-21 o con combinación de IL-7 e IL-15 en ausencia de estimulación hasta el día 13. Las células se evaluaron con respecto a números de células por exclusión con azul de tripano (Figura 6A) y porcentaje de Tcm (CD62L+CD45RO+) de células T CD8 usando análisis de FACS (Figura 6B). Para cada punto temporal, los datos representan el promedio \pm ET de n experimentos independientes.

Las Figuras 7A-C representan un experimento típico que demuestra el papel de IL-21 en las fases de sensibilización y expansión de Tcm antiterceros. Debe observarse que la retirada de IL-21 de la fase de sensibilización redujo tanto la expansión como la inducción de Tcm, mientras que la presencia de IL-21 a lo largo del cultivo aumentó la inducción de Tcm. La Figura 7A ilustra células T CD8 sin tratamiento previo que se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en un medio que contenía IL-21 durante 3 días. A continuación, las células no recibieron ninguna activación adicional y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 13 ("grupo de control de referencia" = d(0-3) IL21+DC d(3-13)IL7+IL15); las Figuras 7B-C ilustran células T CD8 sin tratamiento previo que se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en ausencia de IL-21 durante 3 días. A continuación las células no recibieron ninguna activación adicional y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 13 (Figura 7B) o se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 con presencia continua de IL-21 tanto en la fase de sensibilización (IL-21 sola) como en la fase de expansión (junto con IL-7 e IL-15) (Figura 7C).

Las Figuras 8A-B representan el requisito para IL-21 de rendimiento de Tcm óptimo (promedio de varios experimentos independientes). Se trataron células T CD8 sin tratamiento previo como anteriormente y los cultivos se evaluaron con respecto al número de células por exclusión de azul de tripano (Figura 8A) y porcentaje de Tcm (CD62L+CD45RO+) de células T CD8 usando análisis de FACS (Figura 8B). Los resultados de cada experimento se muestran por separado y las líneas indican los resultados promedio sobre n experimentos.

Las Figuras 9A-B representan la relación de células reactivas/CD óptima para la inducción de fenotipo Tcm y expansión robusta. Se estimularon 4×10^5 células T CD8 sin tratamiento previo frente a terceras CD alogénicas irradiadas a números crecientes en presencia de IL-21 durante 3 días. A continuación las células no recibieron más activación y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 13 ("grupo de control de referencia" = d(0-3) IL21 + 100,00 CD d(3-13) IL7+IL15). Los cultivos se evaluaron con respecto a números de células por exclusión de azul de tripano (Figura 9A) y el porcentaje de Tcm (CD62L+CD45RO+) de células T CD8 usando análisis de FACS (Figura 9B). Los resultados de cada experimento se muestran por separado y las líneas indican los resultados promedio sobre n experimentos.

La Figura 10 representa una evaluación del efecto de diferentes reactivos de uso en GMP en el enriquecimiento de células T CD8+ y CD8+CD45RA+ sin tratamiento previo. Se agotaron las PBMC donantes de células adherentes por incubación durante una noche en placas diseñadas específicamente para retirar células mieloides adherentes (panel superior), y el día 0, se dividieron células no adherentes en cuatro grupos de ensayo, cada uno sometido a un protocolo de clasificación magnética diferente. Las células se evaluaron con respecto a composición celular y fenotipo de Tcm por análisis de FACS. Los resultados en la columna izquierda (CD45RO y CD45RA) se seleccionan en células CD3+CD8+. Los resultados representan un experimento típico de dos experimentos independientes realizados.

La Figura 11 representa un experimento típico que muestra el efecto de diferentes reactivos de uso de GMP usados para aislar células T CD8, en la proporción de células T CD8+ con un fenotipo de Tcm, y contaminación con células NK y NKT, 7 días después de la simulación con terceras CD. Las células no estimuladas mantenidas en cultivo con IL-7 solamente (panel superior) se usaron como referencia. Los resultados en la columna izquierda (CD45RO y CD45RA) y en la columna derecha (CD62L y CD45RO) se seleccionan en células CD3+CD8+.

La Figura 12 representa un experimento típico que muestra el efecto de diferentes reactivos de uso en GMP usados para aislamiento de células T CD8, en la proporción de células T CD8+ con un fenotipo de Tcm, y contaminación con células NK y NKT, 14 días después de la estimulación con terceras CD. Las células no estimuladas mantenidas en cultivo con IL-7 solamente (panel superior) se usaron como referencia. Los resultados en la columna izquierda (CD45RO y CD45RA) y en la columna derecha (CD62L y CD45RO) se seleccionan en células CD3+CD8+.

Las Figuras 13A-B representan el efecto de diferentes reactivos de uso en GMP usados para aislamiento de células T CD8 en los niveles de células T CD8 con un fenotipo de Tcm después de 7 días de estimulación frente a terceras CD. El porcentaje promedio de células T NKT CD3+CD8+ (Figura 13A) y Tcm (Figura 13B) se muestra como porcentaje de los niveles obtenidos en el grupo de control óptimo haciendo uso de los 4 reactivos (CD4/CD56/CD19/CD45RA).

Las Figuras 14A-C representan el efecto de diferentes reactivos de uso en GMP usados para aislamiento de células T CD8 en la producción final de células T CD8 con un fenotipo de Tcm después de 10 días de estimulación frente a terceras CD. El factor de expansión promedio del día 0 al día 10 (Figura 14A), y el rendimiento promedio después de clasificación magnética (Figura 14B) se muestran como porcentaje de los niveles obtenidos en el grupo de control óptimo haciendo uso de los cuatro reactivos de selección (CD4/CD56/CD19/CD45RA). El rendimiento de Tcm el día 10 (Figura 14C) se calculó multiplicando el rendimiento después de la clasificación magnética (el día 0) con el factor de expansión desde el día 0 (al día 10).

La Figura 15 representa que el cambio de la fuente de estimulantes de CD alogénicas tuvo solamente efectos menores en el potencial de expansión de las células Tcm. Las células T CD8 se enriquecieron a partir de leucoféresis descongelada por agotamiento de células CD4+ y CD56+ usando el sistema CliniMacs. Las células T CD8 enriquecidas se dividieron después en dos grupos de ensayo, cada uno estimulado con diferentes terceras CD alogénicas irradiadas, a una relación de 6:1 en un medio que contenía IL-21 durante 3 días en bolsas de cultivo. A continuación, las células no recibieron más activación y se expandieron en medio que contenía IL-7, IL-15 e IL-21 hasta el día 11. Los días 5, 7, 9 y 11 de cultivo se determinó el número de células por exclusión de azul de tripano.

Las Figuras 16A-B representan que el cambio de la fuente para estimulantes de CD alogénicas tuvo solamente efectos menores en la composición celular. Las células T CD8 se enriquecieron a partir de leucoféresis

descongelada por agotamiento de células CD4+ y CD56+ usando el sistema CliniMacs para aislamiento a gran escala. Las células T CD8 enriquecidas se dividieron después en dos grupos de ensayo, cada uno estimulado con diferentes terceras CD alogénicas irradiadas (Figuras 16A y 16B, respectivamente), a una relación de 6:1 en un medio que contenía IL-21 durante 3 días en bolsas de cultivo. A continuación, las células no recibieron más activación y se expandieron en medio que contenía IL-7, IL-15 e IL-21 hasta el día 11. Los días 0, 5, 9 y 12 de cultivo las células se evaluaron con respecto a la composición celular por análisis de FACS. Todos los resultados se seleccionan a partir de linfoselección y selección en vivo (7AAD-).

Las Figuras 17A-B representan que el cambio de la fuente de estimulantes de CD alogénicas tuvo solamente efectos menores en la composición celular. Se enriquecieron células T CD8 a partir de leucofóresis descongelada por agotamiento de células CD4+ y CD56+ usando el sistema CliniMacs. Las células T CD8 enriquecidas se dividieron después en dos grupos de ensayo, cada uno estimulado con diferentes terceras CD alogénicas irradiadas, a una relación de 6:1 en un medio que contenía IL-21 durante 3 días en bolsas de cultivo. A continuación, las células no recibieron más activación y se expandieron en medio que contenía IL-7, IL-15 e IL-21 hasta el día 11. Los días 0, 5, 9 y 12 de cultivo las células se evaluaron con respecto a la composición de fenotipo de Tcm (CD45RO+CD62L+) por análisis de FACS. Todos los resultados se seleccionan a partir de linfoselección y selección en vivo (7AAD-) y células T CD8 (CD3+CD8+CD56-CD16-).

La Figura 17C representa el porcentaje de células apoptóticas después de 22 horas de reacción de linfocitos mixtos (RLM) con linfoma de células B y líneas celulares de leucemia de células plasmáticas. Se incubaron líneas celulares mutante H.My2 C1R HLA A2 K66A, Daudi, premarcadas con calceínaAM o L363 durante 22 horas con o sin exceso quintuple de Tcm antiterceros. Se determinaron las células anexina V+ por FACS. Los datos se muestran como la media \pm DT de cultivos quintuplicados. Los valores de ***p < 0,001 indican cambios estadísticamente significativos en comparación con muestras cultivadas en ausencia de Tcm.

La Figura 18 representa un experimento típico que muestra enriquecimiento con respecto a células T CD8, el día 14 antes del ensayo de injerto contra leucemia (GVL), agotando exhaustivamente las células no T CD8 (es decir, células T CD4+, células T γ/δ , células B, células NK, células dendríticas, monocitos, granulocitos y células eritroides) usando clasificación por perlas magnéticas.

Las Figuras 19A-D representan líneas celulares linfoblastoides de células B H.My C1R ("Neo") y transfectante mutante H.My C1R HLA A2 K66A ("K66A") que se marcaron con calceínaAM, un colorante vital que se libera tras la muerte celular y después se incubaron durante 22 horas con o sin células Tcm antiterceros a una relación 1 a 5 en favor de células Tcm antiterceros. Después de 22 horas, las células se recuperaron y se analizaron con respecto a supervivencia midiendo el número de células teñidas calceína+ supervivientes, y con respecto a apoptosis por células anexinaV+ de la población calceína+ por FACS. Las Figuras 19A-B y las Figuras 19C-D representan dos experimentos independientes, respectivamente; las Figuras 19A y 19C muestran destrucción mientras que las Figuras 19B y 19D muestran apoptosis.

El porcentaje de destrucción de células de la línea de linfoblasto B se calculó por la siguiente fórmula:

$$\left(1 - \frac{\text{el número de células de línea de linfoblastos B vivas en el pocillo evaluado}}{\text{el número de células de línea de linfoblastos B vivas en el pocillo de control}} \right) \times 100$$

Los valores negativos significan que las líneas celulares linfoblastoides de células B proliferaron en presencia de Tcm.

El porcentaje de células de líneas de linfoblastos B que experimentan apoptosis específica se calculó por la siguiente fórmula: = (% de células de línea de linfoblastos B calceína+anexinaV+ en el pocillo evaluado) - (% de células de línea de linfoblastos B calceína+anexinaV+ en el pocillo de control).

La Figura 20 representa el efecto de diferentes reactivos de uso de GMP usados para aislar células T CD8 en los niveles de destrucción de K66A. Las líneas celulares transfectadas mutantes H.My C1R HLA A2 K66A se incubaron durante 22 horas con o sin células Tcm antiterceros a una relación 1 a 5 en favor de células Tcm antiterceros. Después de 22 horas, las células se recuperaron y se analizaron con respecto a supervivencia midiendo el número de células teñidas calceína+ supervivientes por FACS (media de dos experimentos independientes). El porcentaje promedio de destrucción de células mutantes H.My C1R HLA A2 K66A se muestra como porcentaje de los niveles obtenidos por el grupo de control óptimo aislado haciendo uso de los cuatro reactivos (CD4/CD56/CD19/CD45RA).

Las Figuras 21-22 son ilustraciones esquemáticas que representan protocolos para la generación de Tcm para trasplante autólogo (Figura 21) y alogénico (Figura 22).

Las Figuras 23A-D representan un experimento típico que demuestra el papel del momento de adición de citocinas en la inducción de fenotipo de Tcm en células T CD8 estimuladas por terceras CD maduras derivadas de monocitos alogénicas. La Figura 23A ilustra células T CD8 sin tratamiento previo que se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en un medio que contenía IL-21 durante 3 días. A continuación, las células no recibieron activación adicional y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 13 ("grupo de control de referencia" = d(0-3) IL21+CD d(3-13)IL7+IL15); la Figura 23B ilustra células T CD8 sin tratamiento previo que se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 durante 7 días. A

continuaación las células no recibieron más activación y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 13; la Figura 23C ilustra células T CD8 que se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 con presencia continua de IL-21 tanto en la fase de sensibilización (IL21 solamente) como en la fase de expansión (junto con IL-15); la Figura 23D ilustra células T CD8 que se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 con privación de citocinas durante 7 días. A continuación, las células no recibieron más activación y se expandieron con IL-15 solamente hasta el día 13.

Las Figuras 24A-B representan el papel del momento de adición de citocinas en el modelo alogénico humano; sumario de experimentos. Las células T CD8 sin tratamiento previo se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en un medio que contenía IL-21 durante 3 días. A continuación las células no recibieron más activación y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 13 ("grupo de control de referencia" = d(0-3) IL21→ d(3-13)IL7+IL15). Los otros grupos se trataron como se indica en las gráficas. Los cultivos se evaluaron con respecto a números de células por exclusión de azul de tripano (Figura 24A), y porcentaje de Tcm (CD62L+CD45RO+) de células T CD8 usando análisis de FACS (Figura 24B). Para cada punto temporal los datos representan el promedio ± ET del número indicado (n) de experimentos independientes.

La Figura 25 representa el enriquecimiento de células T CD8 específicas antiterceros por selección positiva de células CD137+. Se estimularon células T CD8 sin tratamiento previo con terceras CD alogénicas irradiadas (a una relación de 5,7:1) en presencia de IL-21. Después de 14 horas de activación, las células CD137+ se seleccionaron positivamente por clasificación magnética. La expresión de CD 137 en células T CD8 se evaluó por FACS.

La Figura 26 representa que el enriquecimiento de células T CD8 específicas antiterceros por selección positiva de células CD137+ no reduce la adquisición de fenotipo Tcm. Se estimularon células T CD8 sin tratamiento previo con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 durante 3 días. A continuación, las células no recibieron más activación y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 10 ("Grupo de control de referencia"). Como alternativa, se estimularon células T CD8 sin tratamiento previo con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 5,7:1 en presencia de IL-21. Después de 14 horas de activación, Las células CD137 se seleccionaron positivamente por clasificación magnética. Las células CD137 se volvieron a estimular después con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 hasta el día 3. A continuación las células se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 10. Las células se evaluaron con respecto a porcentaje de Tcm (CD62L+CD45RO+) de células T CD8 por análisis de FACS.

La Figura 27 representa una comparación de cinética de proliferación. Las células T CD8 sin tratamiento previo se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 durante 3 días. Las células no recibieron más activación a continuación y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 14 ("grupo de control de referencia"). Como alternativa, las células T CD8 sin tratamiento previo se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 5,7:1 en presencia de IL-21. Después de 14 horas de activación, las células CD137+ se seleccionaron positivamente por clasificación magnética. Las células CD137+ se volvieron a estimular con terceras CD alogénicas irradiadas en una relación de 4:1 en presencia de IL-21 hasta el día 3. A continuación, las células se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 10. El día 10, las células se dividieron en dos grupos de ensayo. En el primer grupo las células continuaron expandiéndose con IL-7 e IL-15 hasta el día 14 ("CD137+ antiterceros") mientras que las células en el segundo grupo de ensayo se activaron con PBMC hospedadoras irradiadas en presencia de IL-7 e IL-15 (a una relación de 1 a 2). Después de 24 horas, las células CD137+ se agotaron por clasificación magnética. Las células CD137 agotadas se volvieron a sembrar con IL-7 e IL-15 y se cultivaron hasta el día 14 ("CD137+ antiterceros y CD137- antihospedador"). Los días indicados, las células se contaron por exclusión de azul de tripano.

La Figura 28 representa agotamiento de clones específicos antihospedador por agotamiento de células CD137+ después de activación con PBMC hospedadoras irradiadas. El día 10 de cultivo, 9 días después de la selección positiva de clones específicos antiterceros, las células se activaron por PBMC hospedadoras irradiadas (a una relación 1:2, en favor de las PBMC hospedadoras) en presencia de IL-7 e IL-15. Después de 24 h, se agotaron las células CD137+ de las células. La expresión de CD137 en células T CD8 se evaluó por análisis de FACS.

La Figura 29 representa una técnica de clasificación magnética de dos estadios, basándose en la regulación positiva de CD137 después de activación específica de antígeno de células T CD8 que agota con éxito clones antihospedador y aumenta el porcentaje de células específicas para terceros antígenos. Las células T CD8 sin tratamiento previo se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 durante 3 días. Las células no recibieron más activación en lo sucesivo y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 14 ("grupo de control de referencia"). Como alternativa, se estimularon células T CD8 sin tratamiento previo con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 5,7:1 en presencia de IL-21. Después de 14 horas de activación, las células CD137+ se seleccionaron positivamente por clasificación magnética. Las células CD137+ se volvieron a estimular con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 hasta el día 3. A continuación, las células se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 10. El día 10, las células se dividieron en dos grupos de ensayo. En el primer grupo las células continuaron expandiéndose con IL-7 e IL-15 hasta el día 14 ("CD137+ antiterceros") mientras que las células en el segundo grupo de ensayo se activaron con PBMC hospedadoras irradiadas en presencia de IL-7 e IL-15 (a una relación de 1 a 2). Después de 24 horas, las células

CD137+ se agotaron por clasificación magnética. Las células CD137 agotadas se volvieron a sembrar con IL-7 e IL-15 y se cultivaron hasta el día 14 ("CD137+ antiterceros y CD137- antihospedador"). El día 14, se evaluó la alorreactividad antiterceros y antihospedador mediante ensayo de CFSE contra terceros o PBMC hospedadoras irradiadas. Para el ensayo de CFSE, se incubaron 1×10^6 células que respondían CFSE+ con o sin 2×10^6 estimulantes de PBMC irradiados (20 Gy) durante 84 h en presencia de IL-7. Después de 84 h, las células se recuperaron y se analizaron con respecto a división celular midiendo el número de células T CD8 con baja tinción de CFSE (CD3+CD8+CD56-) por FACS. Para obtener valores absolutos de células, las muestras se suspendieron en un volumen constante y se obtuvieron recuentos citométricos de flujo para cada muestra durante un periodo de tiempo constante, predeterminado. El número de células en división específicas = (número de células en división con APC) - (número de células en división sin APC). Los valores negativos significan que el número de células en división en respuesta a la activación con PBMC hospedadoras fue incluso más bajo que el número de células en división sin ninguna activación.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células antiterceros inductoras de tolerancia y/o reactivas para injerto contra leucemia que comprenden fenotipo de linfocito T de memoria central y, más particularmente, pero no exclusivamente, a métodos para generarlas y al uso de las mismas en el trasplante y en el tratamiento de enfermedad.

Los principios y la operación de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada necesariamente en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificada en los ejemplos. La invención tiene capacidad para otras realizaciones o puede practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleada en el presente documento es para fin de describir y no debería interpretarse como limitante.

Al reducir la presente invención a la práctica, los presentes inventores han descubierto una población mejorada de células T de memoria central (Tcm) antiterceros que se dirige a los ganglios linfáticos después de trasplante e induce tolerancia y actividad antienfermedad (por ejemplo actividad de injerto contra leucemia (GVL)) sin inducir una reacción de injerto contra hospedador (GVH).

Como se muestra posteriormente en el presente documento y en la sección de ejemplos a continuación, los presentes inventores han proporcionado nuevos métodos para generar células Tcm para aplicaciones alogénicas y autólogas. Como se muestra en las Figuras 1A y 21, se generaron células Tcm autólogas, que están dotadas de actividad antienfermedad (por ejemplo actividad antitumoral) exponiendo en primer lugar células T CD8+ a estímulos alogénicos (por ejemplo, células dendríticas) en presencia de IL-21 durante 3 días y añadiendo posteriormente IL-15 e IL-7 a las células con los estímulos antigénicos durante otros 1-2 días. A continuación, las células resultantes se cultivaron en un ambiente sin antígenos en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 durante 6-8 días adicionales.

Como se representa en las Figuras 1B y 22, se generaron células Tcm alogénicas, que son células inductoras de tolerancia y están dotadas de actividad GVL, exponiendo en primer lugar células T CD8+ a terceros estímulos (por ejemplo células dendríticas) en presencia de IL-21 durante 3 días. Aproximadamente 14 horas después del comienzo del cultivo, las células activadas se seleccionaron por selección positiva de CD137+, y estas células se volvieron a cultivar con IL-21. Posteriormente, se añadieron IL-15 e IL-7 al cultivo de IL-21 con los estímulos antigénicos durante otros 1-2 días. A continuación, las células resultantes se cultivaron en un ambiente sin antígenos en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 durante 6-8 días adicionales. Al final del cultivo, las células Tcm se empobrecieron con respecto a células alorreactivas por agotamiento de células CD137 después de contacto de las células Tcm con células presentadoras de antígenos de tipo hospedador (por ejemplo células dendríticas).

Las células generadas por los presentes inventores comprendían más del 50 % de células CD3+CD8+ de las que más del 50 % son células Tcm (es decir comprenden una identificación CD3+, CD8+, CD62L+, CD45RA+, CD45RO+, véase por ejemplo el Ejemplo 1 de la sección de ejemplos a continuación) y comprendían actividad antileucémica independiente de TCR (véase Ejemplo 2).

Tomados juntos, estos resultados justifican el uso de células Tcm antiterceros como células facilitadoras de injertos y para uso en el tratamiento de enfermedades y situaciones en las que está justificado el trasplante alogénico (por ejemplo trasplante de células madre hematopoyéticas o en trasplante de órganos sólidos). Además, estos resultados fundamentan el uso de células Tcm antiterceros en el tratamiento de enfermedad en situaciones en las que es necesario trasplante autólogo, tal como para tumores malignos hematológicos.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona una población aislada de células que comprenden células antiterceros no inductoras de GVHD que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria

central (Tcm), siendo las células inductoras de tolerancia y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de trasplante.

5 La expresión "población aislada de células" como se usa en el presente documento se refiere a células que se han aislado de su ambiente natural (por ejemplo, el cuerpo humano).

10 La expresión "no GVHD" como se usa en el presente documento se refiere a tener sensibilidad inductora de injerto contra hospedador sustancialmente reducida o no tener sensibilidad inductora de injerto contra hospedador. Por lo tanto, las células de la presente invención se generan para no provocar significativamente enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) como se demuestra por la supervivencia, el peso y la apariencia general del sujeto trasplantado 100 días después del trasplante.

15 Como se usa en el presente documento, el término "singénico" se refiere a una célula o a un tejido que procede de un individuo que es, en esencia, genéticamente idéntico al sujeto. Típicamente, son singénicos mamíferos en esencia totalmente endogámicos, clones de mamíferos o mamíferos gemelos homocigóticos.

Los ejemplos de células o tejidos singénicos incluyen células o tejidos procedentes del sujeto (también denominado en la técnica "autólogo"), un clon del sujeto o un gemelo homocigótico del sujeto.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "no singénico" se refiere a una célula o un tejido que procede de un individuo que es alogénico o xenogénico con los linfocitos del sujeto.

25 Como se usa en el presente documento, el término "alogénico" se refiere a una célula o un tejido que procede de un donante que es de la misma especie que el sujeto, pero que es sustancialmente no clonal con el sujeto. Típicamente, los mamíferos no gemelares cigóticos, exogámicos de la misma especie son alogénicos entre sí. Se apreciará que un donante alogénico puede ser HLA idéntico o HLA no idéntico con respecto al sujeto.

30 Como se usa en el presente documento, el término "xenogénico" se refiere a una célula o un tejido que expresa sustancialmente antígenos de una especie diferente en relación con la especie de una proporción sustancial de los linfocitos del sujeto. Típicamente, los mamíferos exogámicos de diferentes especies son xenogénicos entre sí.

35 La presente invención prevé que células o tejidos xenogénicos proceden de una diversidad de especies tales como, pero sin limitación, bovinos (por ejemplo, vaca), equinos (por ejemplo, caballo), porcinos (por ejemplo cerdo), ovinos (por ejemplo, cabra, oveja), felinos (por ejemplo, *Felis domestica*), cánidos (por ejemplo, *Canis domestica*), roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya, gerbo, hámster) o primates (por ejemplo, chimpancé, mono rhesus, macaco, tití).

40 Las células o tejidos de origen xenogénico (por ejemplo origen porcino) se obtienen preferentemente de una fuente que se sabe que está libre de zoonosis, tales como retrovirus endógenos porcinos. De forma similar, las células o los tejidos procedentes de seres humanos, se obtienen preferentemente de fuentes sustancialmente sin patógenos.

45 La expresión "células antiterceros" como se usa en el presente documento, se refiere a linfocitos (por ejemplo, linfocitos T) que se dirigen (por ejemplo, por reconocimiento de células T) contra un tercer antígeno o terceros antígenos.

Como se usa en el presente documento la expresión "tercer antígeno o terceros antígenos" se refiere a un antígeno o antígenos solubles o no solubles (tales como asociados a membrana), que no están presentes en el donante o el receptor, como se representan en detalle posteriormente.

50 Por ejemplo, terceros antígenos pueden ser terceras células, antígenos de virus, tales como por ejemplo, virus de Epstein-Barr (VEB) o citomegalovirus (CMV) o antígenos de bacterias, tales como flagelina. Los antígenos víricos o bacterianos pueden ser presentados por células (por ejemplo, línea celular) infectadas con los mismos o a las que se ha hecho de otro modo expresar proteínas víricas/bacterianas. Las células presentadoras de antígenos autólogas o no autólogas pueden usarse para presentar péptidos sintéticos cortos fusionados o cargados con las mismas. Dichos péptidos cortos pueden ser péptidos procedentes de virus o péptidos que representan cualquier otro antígeno.

60 Puede usarse software dedicado para analizar secuencias víricas u otras para identificar péptidos cortos inmunogénicos, es decir, péptidos presentables en el contexto de MHC de clase I o MHC de clase II.

65 Las terceras células pueden ser alogénicas o xenogénicas con respecto al receptor (explicado en más detalle posteriormente en el presente documento). En el caso de terceras células alogénicas, dichas células tienen antígenos de HLA diferentes del donante pero que no reaccionan de forma cruzada con los antígenos del HLA del receptor, de modo que las terceras células generadas contra dichas células no son reactivas contra un trasplante o antígenos receptores.

De acuerdo con una realización de la presente invención las terceras células alogénicas o xenogénicas son células estimulantes seleccionadas del grupo que consiste en células purificadas de linfocitos de sangre periférica (PBL), bazo o ganglios linfáticos, PBL movilizados por citocinas, células presentadoras de antígenos (APC) expandidas *in vitro*, células dendríticas expandidas *in vitro* (CD) y células presentadoras de antígenos artificiales.

La APC artificial de la presente invención puede modificarse técnicamente para mostrar MHC autólogo con un tercer péptido o un tercer MHC sin someterse a pulsos con un péptido exógeno. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, la APC artificial comprende células tumorales K562 transfectadas con un tercer determinante de MHC y una molécula coestimulante [como se ha descrito previamente por ejemplo en Suhoski MM *et al.*, Mol Ther. (2007) 15(5): 981-8], o fibroblastos transfectados con las mismas.

Pueden presentarse terceros antígenos en las superficies celular, vírica o bacteriana u obtenerse y/o purificarse de las mismas. Adicionalmente, puede presentarse un antígeno vírico o bacteriano en una célula infectada y puede presentarse un antígeno celular en un vehículo artificial tal como un liposoma o en una célula presentadora de antígeno artificial (por ejemplo línea celular leucémica o fibroblástica con el tercer antígeno o los terceros antígenos).

El tercer antígeno puede comprender además un péptido sintético presentado por células presentadoras autólogas, células presentadoras no autólogas o en un vehículo artificial o en células presentadoras de antígenos artificiales.

Además, los terceros antígenos pueden, por ejemplo, ser proteínas extraídas o purificadas de una diversidad de fuentes. Un ejemplo de una proteína purificada que puede actuar como un tercer antígeno de acuerdo con la presente invención es ovoalbúmina. Se prevén otros ejemplos.

La utilización de células, virus, bacterias, células infectadas por virus, infectadas por bacterias, presentadoras de péptidos víricos o de péptidos bacterianos como terceros antígenos es particularmente ventajosa ya que dichos terceros antígenos incluyen una serie diversa de determinantes antigénicos y como tales dirige la formación de células antiterceros de una población diversa, que pueden actuar adicionalmente en reconstitución más rápida de células T en casos en los que se requiera dicha reconstitución, por ejemplo, después de irradiación letal o subletal o procedimiento quimioterapéutico.

Además, cuando se dirigen células antiterceros contra terceros antígenos, las células están dotadas de actividad antienfermedad. La expresión "actividad antienfermedad" se refiere a la actividad (por ejemplo capacidad de destrucción) de las células Tcm contra una célula enferma (por ejemplo célula cancerosa, tal como actividad de injerto contra leucemia, GVL). Esta actividad se debe típicamente a destrucción independiente de TCR mediada por unión con LFA1-I/CAM1 [Arditti *et al.*, Blood (2005) 105(8):3365-71. Epub 6 Jul 2004].

De acuerdo con una realización, las terceras células comprenden células dendríticas.

De acuerdo con una realización, las terceras células comprenden células dendríticas maduras.

Los métodos para generar terceras células dendríticas, que pueden usarse como células estimulantes para inducir células Tcm, se conocen bien en la técnica. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, pueden obtenerse células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de un tercer donante de células no singénicas [por ejemplo en el caso de que las células Tcm sean singénicas, por ejemplo autólogas, las células dendríticas (CD) pueden no ser singénicas, por ejemplo alogénicas, con respecto al sujeto; mientras que si las células Tcm son no singénicas, por ejemplo alogénicas, las CD se seleccionan de un donante que no es singénico, por ejemplo alogénico y HLA desapareado tanto con el sujeto como con las células Tcm]. Los monocitos pueden después aislarse por adherencia a plástico y cultivarse (por ejemplo en placas de cultivo celular) usando medio de células CD (por ejemplo medio de CD Cellgro) complementado con suero humano (por ejemplo suero humano al 1 %), penicilina/estreptomina y GM-CSF (800 UI/ml) e IL-4 (20 ng/ml) (disponible de por ejemplo Peptotech, Hamburgo, Alemania). Después de aproximadamente 48 h de cultivo, puede añadirse medio de CD que comprende GM-CSF (1600 UI/ml) e IL-4 (20 ng/ml). Aproximadamente 24 h después, pueden recogerse células no adherentes, y pueden resuspenderse células grandes (principalmente CD inmaduras) en medio nuevo que contiene GM-CSF (800 UI/ml), IL-4 (20 ng/ml), LPS (por ejemplo de *E. coli* O55:B5 a 10 ng/ml) e IFN γ 100 UI/ml (disponible de por ejemplo Peptotech, Hamburgo, Alemania), sembrarse en placas e incubarse durante una noche. Al día siguiente, las células no adherentes pueden descartarse, y pueden retirarse suavemente CD adherentes usando, por ejemplo PBS frío/HS 1 % después de incubación en hielo durante 20 minutos, obteniendo de este modo células grandes que consisten en CD maduras.

De acuerdo con una realización, las terceras células comprenden células dendríticas irradiadas.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización, las CD se irradian con aproximadamente 5-10 Gy, aproximadamente 10-20 Gy, aproximadamente 20-30 Gy, aproximadamente 20-40 Gy, aproximadamente 20-50 Gy, aproximadamente 10-50 Gy. De acuerdo con una realización específica, las CD se irradian con aproximadamente 10-50 Gy (por ejemplo 30 Gy).

De acuerdo con algunas realizaciones, las células antiterceros de la presente invención comprenden un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm).

5 La expresión "fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm)" como se usa en el presente documento se refiere a un subconjunto de células T citotóxicas que se dirigen a los ganglios linfáticos. Las células que tienen el fenotipo Tcm, en seres humanos, típicamente comprenden una identificación CD3+/CD8+/CD62L+/CD45RO+/CD45RA-. Se apreciará que las células Tcm pueden expresar todos los marcadores de identificación en una única célula o pueden expresar solamente parte de los marcadores de identificación en una única célula.

10 Se apreciará al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o incluso 100 % de la población aislada de células son células CD3+CD8+. De acuerdo con una realización específica, la población aislada de células comprende aproximadamente 70-90 % de células CD3+CD8+.

15 Se apreciará que al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o incluso 100 % de las células CD3+CD8+ tienen la identificación de células Tcm. De acuerdo con una realización específica, aproximadamente 30-80 % de las células CD3+CD8+ tienen la identificación celular de Tcm (por ejemplo 40-50 %).

20 De acuerdo con una realización, se proporciona una población aislada de células que comprenden células antiterceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), en el que al menos el 50 % de la población aislada de células son células CD3+CD8+ de las que al menos el 50 % comprenden una identificación CD3+, CD8+, CD62L+, CD45RA-, CD45RO+, y además en las que las células son células inductoras de tolerancia y/o están dotadas de actividad antienfermedad (por ejemplo actividad de injerto contra leucemia (GVL)), y son capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de trasplante.

25 Como se ha mencionado, las células Tcm típicamente se dirigen a los ganglios linfáticos después del trasplante. De acuerdo con algunas realizaciones las células Tcm antiterceros de la presente invención pueden dirigirse a cualquiera de los ganglios linfáticos después del trasplante, como por ejemplo, los ganglios linfáticos periféricos y ganglios linfáticos mesentéricos. La naturaleza dirigida de estas células permite que ejerzan su efecto de tolerancia de una manera rápida y eficaz.

Por lo tanto, las células Tcm antiterceros de la presente invención son células inductoras de tolerancia.

35 La expresión "células inductoras de tolerancia" como se usa en el presente documento se refiere a células que provocan reducción de la sensibilidad de las células receptoras (por ejemplo células T receptoras) cuando entran en contacto con las mismas en comparación con la sensibilidad de las células receptoras en ausencia de células inductoras de tolerancia administradas. Las células inductoras de tolerancia incluyen células de veto (es decir células T que conducen a la apoptosis de células T hospedadoras tras el contacto con las mismas) como se ha descrito previamente en las publicaciones de PCT n.º WO 2001/049243 y WO 2002/102971.

40 De acuerdo con algunas realizaciones, las células Tcm de la presente invención pueden ser células no modificadas genéticamente o células modificadas genéticamente (por ejemplo células que se han modificado por ingeniería genética para expresar o no expresar genes, marcadores o péptidos específicos o para secretar o no secretar citocinas específicas). Puede implementarse cualquier método conocido en la técnica en la modificación por ingeniería genética de las células, tal como por inactivación del gen o los genes relevantes o por inserción de un ARN antisentido que interfiere con la expresión polipeptídica (véase por ejemplo, documento WO/2000/039294, que se incorpora por la presente por referencia).

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención se proporciona un método para generar la población aislada de células, comprendiendo el método: (a) poner en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un tercer antígeno o terceros antígenos en presencia de IL-21 para permitir el enriquecimiento de células reactivas a antígenos; y (b) cultivar las células resultantes de la etapa (a) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm).

55 Las células Tcm antiterceros de la presente invención se generan típicamente poniendo en contacto en primer lugar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) singénicas o no singénicas con un tercer antígeno o terceros antígenos (tal como se ha descrito anteriormente) en un cultivo complementado con IL-21 (de otro modo en cultivo sin citocinas, es decir, sin la adición de cualquier citocina adicional). Esta etapa se lleva a cabo típicamente durante aproximadamente 12-24 horas, aproximadamente 12-36 horas, aproximadamente 12-72 horas, 24-48 horas, 24-36 horas, aproximadamente 24-72 horas, aproximadamente 48-72 horas, 1-2 días, 2-3 días, 1-3 días, 2-4 días, 1-5 días, 2-5 días, 2-6 días, 1-7 días, 5-7 días, 2-8 días, 8-10 días o 1-10 días y permite el enriquecimiento de células reactivas a antígenos. De acuerdo con una realización específica, la puesta en contacto de PBMC singénicas o no singénicas con un tercer antígeno o terceros antígenos (tal como se ha descrito anteriormente) en un cultivo complementado con IL-21 (de otro modo cultivo sin citocinas) se efectúa durante 1-5 días (por ejemplo 3 días. Esta

- 5 etapa se lleva a cabo típicamente en presencia de aproximadamente 0,001-3.000 ng/ml, 0,001-1.000 ng/ml, 0,01-1.000 ng/ml, 0,1-1.000 ng/ml, 1-1.000 ng/ml, 10-1.000 ng/ml, 10-500 ng/ml, 10-300 ng/ml, 10-100 ng/ml, 100-1000 ng/ml, 1-100 ng/ml, 1-50 ng/ml, 1-30 ng/ml, 10-50 ng/ml, 10-30 ng/ml, 10-20 ng/ml, 20-30 ng/ml, 20-50 ng/ml, 30-50 ng/ml, 30-100 ng/ml, 1-10 ng/ml, 0,1-10 ng/ml, 0,1-100 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml-100 ng/ml de IL-21. De acuerdo con una realización específica, la concentración de IL-21 es de 10-50 ng/ml (por ejemplo 30 ng/ml).
- 10 De acuerdo con una realización específica, la puesta en contacto de las PBMC singénicas o no singénicas con un tercer antígeno o terceros antígenos se efectúa en un cultivo sin citocinas (por ejemplo complementado solamente con IL-21). Dicha condición de cultivo permite la supervivencia y el enriquecimiento solamente de las células que experimentan estimulación y activación por el tercer antígeno o los terceros antígenos (es decir de células reactivas a antígenos) ya que estas células secretan citocinas (por ejemplo IL-2) que permiten su supervivencia (todas las demás células mueren en estas condiciones de cultivo).
- 15 La relación de tercer antígeno o terceros antígenos (por ejemplo células dendríticas) con respecto a PBMC es típicamente de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10 tal como aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:8 o aproximadamente 1:10. De acuerdo con una realización específica, la relación de tercer antígeno o terceros antígenos (por ejemplo células dendríticas) con respecto a PBMC es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:8 (por ejemplo 1:4).
- 20 A continuación, las células antiterceros se cultivan en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo Tcm. Esta etapa se lleva a cabo típicamente durante aproximadamente 12-24 horas, aproximadamente 12-36 horas, aproximadamente 12-72 horas, 24-48 horas, 24-36 horas, aproximadamente 24-72 horas, aproximadamente 48-72 horas, 1-20 días, 1-15 días, 1-10 días, 1-5 días, 5-20 días, 5-15 días, 5-10 días, 1-2 días, 2-3 días, 1-3 días, 2-4 días, 2-5 días, 2-8 días, 2-10 días, 4-10 días, 4-8 días, 6-8 días, 8-10 días, 7-9 días, 7-11 días, 7-13 días, 7-15 días, 10-12 días, 10-14 días, 12-14 días, 14-16 días, 14-18 días, 16-18 días o 18-20 días. De acuerdo con una realización específica, las células antiterceros se cultivan en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos durante aproximadamente 7-11 días (por ejemplo 8 días).
- 25 Esta etapa se lleva a cabo típicamente en presencia de IL-21 a una concentración de aproximadamente 0,001-3.000 ng/ml, 0,001-1.000 ng/ml, 0,01-1.000 ng/ml, 0,1-1.000 ng/ml, 1-1.000 ng/ml, 10-1.000 ng/ml, 10-500 ng/ml, 10-300 ng/ml, 10-100 ng/ml, 100-1000 ng/ml, 1-100 ng/ml, 1-50 ng/ml, 1-30 ng/ml, 10-50 ng/ml, 10-30 ng/ml, 10-20 ng/ml, 20-30 ng/ml, 20-50 ng/ml, 30-50 ng/ml, 30-100 ng/ml, 1-10 ng/ml, 0,1-10 ng/ml, 0,1-100 ng/ml, 1 ng/ml-100 ng/ml de IL-21. De acuerdo con una realización específica, la concentración de IL-21 es de 10-50 ng/ml (por ejemplo 30 ng/ml).
- 30 Esta etapa se lleva a cabo adicionalmente en presencia de IL-15 a una concentración de aproximadamente 0,001-3.000 ng/ml, 0,001-1.000 ng/ml, 0,01-1.000 ng/ml, 0,05-1.000 ng/ml, 0,1-1.000 ng/ml, 0,5-1.000 ng/ml, 0,05-500 ng/ml, 0,5-500 ng/ml, 0,1-100 ng/ml, 0,1-10 ng/ml, 0,5-100 ng/ml, 1-100 ng/ml, 5-100 ng/ml, 1-50 ng/ml, 5-50 ng/ml, 1-10 ng/ml, 5-10 ng/ml, 1-5 ng/ml, 2-3 ng/ml, 2-5 ng/ml, 2-7 ng/ml, 3-5 ng/ml, 3-7 ng/ml, 4-5 ng/ml, 5-6 ng/ml, 5-7 ng/ml, 1-8 ng/ml, 10-100 ng/ml, 10-1000 ng/ml, 100-1000 ng/ml. De acuerdo con una realización específica la concentración de IL-15 es 1-10 ng/ml (por ejemplo 5 ng/ml).
- 40 Esta etapa se lleva a cabo adicionalmente en presencia de IL-7 a una concentración de aproximadamente 0,001-3.000 ng/ml, 0,001-1.000 ng/ml, 0,01-1.000 ng/ml, 0,05-1.000 ng/ml, 0,1-1.000 ng/ml, 0,5-1.000 ng/ml, 0,05-500 ng/ml, 0,5-500 ng/ml, 0,1-100 ng/ml, 0,1-10 ng/ml, 0,5-100 ng/ml, 1-100 ng/ml, 5-100 ng/ml, 1-50 ng/ml, 5-50 ng/ml, 1-10 ng/ml, 5-10 ng/ml, 1-5 ng/ml, 2-3 ng/ml, 2-5 ng/ml, 2-7 ng/ml, 3-5 ng/ml, 3-7 ng/ml, 4-5 ng/ml, 5-6 ng/ml, 5-7 ng/ml, 1-8 ng/ml, 10-100 ng/ml, 10-1000 ng/ml, 100-1000 ng/ml. De acuerdo con una realización específica la concentración de IL-7 es 1-10 ng/ml (5 ng/ml).
- 50 Los presentes inventores han recogido mediante experimentación laboriosa y exploración varios criterios que pueden aprovecharse para mejorar la proliferación de células antiterceros que comprenden un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm) que está desprovisto de células reactivas para injerto contra hospedador (GVH) y/o que están potenciadas con respecto a células reactivas anti enfermedad (por ejemplo GVL).
- 55 De acuerdo con una realización, las PBMC se empobrecen con respecto a células no adherentes antes de poner en contacto con un tercer antígeno o terceros antígenos en presencia de IL-21.
- 60 De acuerdo con una realización, las PBMC se empobrecen con respecto a células CD4+ y/o CD56+ antes de poner en contacto con un tercer antígeno o terceros antígenos en presencia de IL-21.
- De acuerdo con una realización, las PBMC se seleccionan con respecto a células CD45RA+ antes de poner en contacto con un tercer antígeno o terceros antígenos en presencia de IL-21.
- 65 El agotamiento de células CD4+ y/o CD56+ puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido en la técnica, tal como por purificación basada en afinidad (por ejemplo tal como mediante el uso de perlas MACS, clasificador de

FACS y/o marcaje de ELISA de captura). Dicha etapa puede ser beneficiosa para aumentar la pureza de las células CD8+ dentro del cultivo (es decir eliminar otros linfocitos dentro del cultivo celular por ejemplo células T CD4+ o células NK) o para aumentar el número de células T CD8+.

De acuerdo con una realización, las PBMC comprenden células no adherentes.

5

De acuerdo con una realización, las PBMC comprenden células T CD8+.

De acuerdo con una realización, las PBMC comprenden células T CD8+ sin tratamiento previo.

10 La selección de células T CD8+ sin tratamiento previo puede efectuarse por selección de células que expresan CD45RA+ y/o células que expresan CD45RO- y puede llevarse a cabo usando cualquier método conocido en la técnica, tal como por purificación basada en afinidad (por ejemplo tal como mediante el uso de perlas MACS, clasificador de FACS y/o marcaje de ELISA de captura).

15 De acuerdo con una realización, las PBMC comprenden células CD45RA+.

Una etapa adicional que puede llevarse a cabo de acuerdo con las presentes enseñanzas incluye cultivar las células PBMC con un tercer antígeno o terceros antígenos en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 antes de retirar el tercer antígeno o los terceros antígenos del cultivo celular (es decir antes de generar un ambiente sin antígenos). Esta etapa se lleva a cabo típicamente durante aproximadamente 12-24 horas, aproximadamente 12-36 horas, aproximadamente 12-72 horas, 24-48 horas, 24-36 horas, aproximadamente 24-72 horas, aproximadamente 48-72 horas, 1-2 días, 2-3 días, 1-3 días, 2-4 días, 1-5 días o 2-5 días, y se efectúa a las mismas dosis de IL-21, IL-15 e IL-7 indicadas anteriormente. De acuerdo con una realización específica, el cultivo de las células PBMC con un tercer antígeno o terceros antígenos en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 se lleva a cabo durante 12 horas hasta 4 días (por ejemplo 1-2 días).

20

Adicionalmente o como alternativa, puede llevarse a cabo un proceso de dos etapas adicional que permite la selección y el aislamiento de células activadas. Dicha etapa de selección ayuda a retirar células T reactivas a hospedadores potenciales en situaciones en las que las PBMC no son singénicas con respecto al sujeto (como se describe en más detalle posteriormente).

30

Por lo tanto, el aislamiento de células activadas puede llevarse a cabo en un enfoque de dos estadios. En el primer estadio las células activadas se seleccionan antes de cultivar las células en presencia de IL-15 e IL-7. Este primer estadio se lleva a cabo típicamente después de la puesta en contacto inicial de las PBMC con un tercer antígeno o terceros antígenos en presencia de IL-21. Este proceso de selección selecciona solamente las células que se activaron por el tercer antígeno (por ejemplo expresan marcadores de activación como se describe posteriormente) y se efectúa típicamente aproximadamente 12-24 horas, aproximadamente 24-36 horas, aproximadamente 12-36 horas, aproximadamente 36-48 horas, aproximadamente 12-48 horas, aproximadamente 48-60 horas, aproximadamente 12-60 horas, aproximadamente 60-72 horas, aproximadamente 12-72 horas, aproximadamente 72-84 horas, aproximadamente 12-84 horas, aproximadamente 84-96 horas, aproximadamente 12-96 horas, después del contacto inicial de las PBMC con un tercer antígeno o terceros antígenos. De acuerdo con una realización específica, el proceso de selección se efectúa aproximadamente 12-24 horas (por ejemplo 14 horas) después del contacto inicial de las PBMC con un tercer antígeno o terceros antígenos.

35

40

45 Puede efectuarse aislamiento de células activadas por purificación basada en afinidad (por ejemplo tal como mediante el uso de perlas MACS, clasificador de FACS y/o marcaje de ELISA de captura) y puede efectuarse hacia cualquier marcador de activación incluyendo marcadores de superficie celular tales como, pero sin limitación, CD69, CD44, CD25, CFSE, CD137 o marcadores que no están en superficie celular tales como, pero sin limitación, IFN- γ e IL-2. También puede efectuarse aislamiento de células activadas por purificación basada en morfología (por ejemplo aislando células grandes) usando cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo mediante FACS). Típicamente, las células activadas también se seleccionan para expresión de células CD8+. Además, puede utilizarse cualquier combinación de los métodos anteriores para aislar eficazmente células activadas.

50

De acuerdo con una realización de la presente invención, se efectúa selección de células activadas por selección de células CD137+ y/o CD25+.

55

El segundo estadio de aislamiento de células activadas se lleva a cabo típicamente al final del cultivo (es decir después de cultivar en un ambiente sin antígenos con IL-21, IL-15 e IL-7). Este estadio agota células alorreactivas por agotamiento de las células que se activaron después del contacto del linfocito T de memoria central (T_{cm}) con células presentadoras de antígenos del hospedador irradiadas (APC, por ejemplo células dendríticas). Como se ha mencionado anteriormente, el aislamiento de células activadas puede efectuarse por purificación basada en afinidad (por ejemplo tal como mediante el uso de perlas MACS, clasificador de FACS y/o marcaje de ELISA de captura) y puede efectuarse hacia cualquier marcador de activación incluyendo marcadores de superficie celular tales como, pero sin limitación, CD69, CD44, CD25, CFSE, CD137 o marcadores que no están en superficie celular tales como, pero sin limitación, IFN- γ e IL-2.

60

65

De acuerdo con una realización de la presente invención, el agotamiento de las células alorreactivas se efectúa por agotamiento de células CD137+ y/o CD25+.

5 A continuación hay varios ejemplos no limitantes de protocolos que pueden usarse de acuerdo con algunas realizaciones de la invención.

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un método para generar una población aislada de células que comprenden células antiterceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo las células células inductoras de tolerancia y/o estando las células dotadas de actividad antienfermedad (por ejemplo actividad de injerto contra leucemia (GVL)), y que son capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de trasplante, comprendiendo el método: (a) tratar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no adherentes con un agente capaz de agotar células CD4+ y/o CD56+ para obtener células T CD8+; (b) poner en contacto las células T CD8+ con terceras células dendríticas en presencia de IL-21 durante 12 horas hasta 5 días para permitir el enriquecimiento de células reactivas a antígeno; (c) cultivar las células resultantes de la etapa (b) con las terceras células dendríticas en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 durante 12 horas hasta 3 días; y (d) cultivar las células resultantes de la etapa (c) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos durante 5-20 días para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm).

20 El protocolo descrito anteriormente se usa típicamente para trasplante no singénico y por lo tanto las PBMC usadas son típicamente alogénicas con respecto al sujeto (por ejemplo de un donante alogénico).

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un método para generar una población aislada de células que comprenden células antiterceros que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), estando las células dotadas de actividad antienfermedad (por ejemplo actividad anti células tumorales) y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de trasplante, comprendiendo el método: tratar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no adherentes con un agente capaz de agotar células CD4+ y/o CD56+ para obtener células T CD8+; (b) poner en contacto las células T CD8+ con células dendríticas no singénicas en presencia de IL-21 durante 12 horas hasta 5 días para permitir el enriquecimiento de células reactivas a antígeno; (c) cultivar las células resultantes de la etapa (b) con las terceras células dendríticas no singénicas en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 durante 12 horas hasta 3 días; y (d) cultivar las células resultantes de la etapa (c) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos durante 5-20 días para permitir la proliferación de células que comprenden el fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm).

35 El protocolo descrito anteriormente se usa típicamente para trasplante singénico y por lo tanto las PBMC usadas son típicamente autólogas con respecto al sujeto (por ejemplo del sujeto).

Por lo tanto, como se ha mencionado, las PBMC pueden ser singénicas o no singénicas con respecto a un sujeto.

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las PBMC no singénicas de la presente invención pueden ser alogénicas o xenogénicas con respecto al sujeto (explicado en más detalle posteriormente en el presente documento).

45 La fuente de las PBMC se determinará con respecto al uso pretendido de las células (véase más detalles posteriormente en el presente documento) y está dentro de la capacidad de un experto en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

50 El uso de células inductoras de tolerancia es especialmente beneficioso en situaciones en las que existe la necesidad de eliminar el rechazo de injertos y superar la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), tal como en el trasplante celular o tisular alogénico o xenogénico.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar a un sujeto que necesite un trasplante celular o tisular, comprendiendo el método realizar un trasplante celular o de órgano al sujeto y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población aislada de células.

55 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o invertir la progresión de una afección, sustancialmente aliviar los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "sujeto" o "sujeto que lo necesite" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, hombre o mujer de cualquier edad que necesite un trasplante celular o tisular o que padezca una enfermedad que pueda tratarse con las células Tcm. Típicamente el sujeto necesita trasplante celular o tisular (también denominado en el presente documento receptor) debido a un trastorno o una afección, estado o síndrome patológico o no deseado, o una anomalía física, morfológica o fisiológica que sea susceptible de tratamiento mediante el trasplante celular o tisular. Se proporcionan posteriormente de forma adicional ejemplos de dichos trastornos.

65

Como se usa en el presente documento, la expresión “trasplante celular o tisular” se refiere a una célula (por ejemplo, una única célula o un grupo de células) o un tejido (por ejemplo tejidos/órganos sólidos o tejidos blandos, que pueden trasplantarse completamente o en parte) corporales. Los tejidos u órganos ejemplares que pueden trasplantarse de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero sin limitación, hígado, páncreas, bazo, riñón, corazón, pulmón, piel, intestino y tejidos linfoides/hematopoyéticos (por ejemplo, ganglio linfático, placas de Peyer, timo o médula ósea). Las células ejemplares que pueden trasplantarse de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero sin limitación, células hematopoyéticas inmaduras incluyendo células madre. Además, la presente invención también contempla trasplante de órganos completos, tales como por ejemplo, riñón, corazón, hígado o piel.

Dependiendo de la aplicación, el método puede efectuarse usando una célula o un tejido que es singénico o no singénico con el sujeto.

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

Dependiendo de la aplicación y las fuentes disponibles, las células o los tejidos de la presente invención pueden obtenerse de un organismo prenatal, organismo posnatal, un adulto o un donante fallecido. Además, dependiendo de la aplicación necesaria, las células o los tejidos pueden ser células o tejidos sin tratamiento previo o modificados genéticamente. Dichas determinaciones están dentro de la capacidad de un experto habitual en la materia.

Puede emplearse cualquier método en la técnica para obtener una célula o un tejido (por ejemplo para trasplante).

El trasplante de la célula o el tejido al sujeto puede efectuarse de diversas formas, dependiendo de diversos parámetros, tales como, por ejemplo, el tipo celular o tisular, el tipo, el estadio o la gravedad de la enfermedad del receptor (por ejemplo insuficiencia orgánica); los parámetros físicos o fisiológicos específicos del sujeto; y/o el resultado terapéutico deseado.

Puede realizarse un trasplante celular o tisular de la presente invención trasplantando las células o el tejido a una de diversas localizaciones anatómicas, dependiendo de la aplicación. El trasplante celular o tisular puede realizarse a una localización anatómica homotópica (una localización anatómica normal para el trasplante) o a una localización anatómica ectópica (una localización anatómica anómala para el trasplante). Dependiendo de la aplicación, el trasplante celular o tisular puede implantarse provechosamente bajo la cápsula renal o en el riñón, la grasa testicular, el tejido subcutáneo, el omento, la vena porta, el hígado, el bazo, la cavidad cardiaca, el corazón, la cavidad torácica, el pulmón, la piel, el páncreas y/o el espacio intraabdominal.

Por ejemplo, un tejido hepático de acuerdo con las presentes enseñanzas puede trasplantarse al hígado, la vena porta, la cápsula renal, el tejido subcutáneo, el omento, el bazo y el espacio intraabdominal. El trasplante de un hígado en diversas localizaciones anatómicas tales como estas se practica habitualmente en la técnica para tratar enfermedades susceptibles de tratamiento mediante trasplante hepático (por ejemplo insuficiencia hepática). De forma similar, el trasplante de un tejido pancreático de acuerdo con la presente invención puede efectuarse provechosamente trasplantando el tejido a la vena porta, el hígado, el páncreas, la grasa testicular, el tejido subcutáneo, el omento, una asa intestinal (las subserosa de una asa en U del intestino delgado) y/o el espacio intraabdominal. El trasplante de tejido pancreático puede usarse para tratar enfermedades susceptibles de tratamiento mediante trasplante pancreático (por ejemplo diabetes). De forma similar, puede llevarse a cabo trasplante de tejidos tales como un riñón, un corazón, un pulmón o tejido cutáneo a cualquier localización anatómica descrita anteriormente para el fin de tratar receptores que padecen, por ejemplo, insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca, insuficiencia pulmonar o daño cutáneo (por ejemplo, quemaduras).

El método de la presente invención también puede usarse, por ejemplo, para tratar a un receptor que padece una enfermedad que requiere trasplante de células hematopoyéticas inmaduras.

En este último caso, pueden trasplantarse células hematopoyéticas autólogas, halogénicas o xenogénicas inmaduras (incluyendo células madre) que pueden proceder, por ejemplo, de médula ósea, sangre periférica movilizada (por ejemplo por leucoféresis), hígado fetal, saco vitelino y/o sangre del cordón umbilical de donante y que son preferentemente células hematopoyéticas inmaduras CD34+ con agotamiento de células T, a un receptor que padece una enfermedad. Dicha enfermedad incluye, pero sin limitación, leucemia tal como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia no linfoblástica aguda (LNLA), leucemia mielocítica aguda (LMA) o leucemia mielocítica crónica (LMC), síndromes de inmunodeficiencia combinada grave (SCID), incluyendo adenosina desaminasa (ADA), osteopetrosis, anemia aplásica, enfermedad de Gaucher, talasemia y otras anomalías hematopoyéticas congénitas o determinadas genéticamente.

Se apreciará que las células hematopoyéticas autólogas, alogénicas o xenogénicas inmaduras de la presente invención pueden trasplantarse a un receptor usando cualquier método conocido en la técnica para trasplante de células, tal como pero sin limitación, infusión celular (por ejemplo I.V.) o mediante una vía intraperitoneal.

Opcionalmente, cuando se realiza un trasplante celular o tisular de la presente invención a un sujeto que tiene un órgano defectuoso, puede ser provechoso en primer lugar retirar al menos parcialmente el órgano defectuoso del sujeto para permitir el desarrollo óptimo del trasplante y la integración estructural/funcional del mismo con la anatomía/fisiología del sujeto.

5 De acuerdo con una realización, las células hematopoyéticas inmaduras y la población aislada de células proceden del mismo donante.

De acuerdo con una realización, las células hematopoyéticas inmaduras y la población aislada de células proceden del mismo sujeto.

10 El método de la presente invención también prevé el cotrasplante de varios órganos (por ejemplo tejidos cardíacos y pulmonares) en caso de que el sujeto pueda verse afectado beneficiosamente por dicho procedimiento.

15 De acuerdo con una realización, el cotrasplante comprende el trasplante de células hematopoyéticas inmaduras y un tejido/órgano sólido o varios órganos/tejidos sólidos.

De acuerdo con una realización, las células hematopoyéticas inmaduras y el órgano sólido u obtenido del mismo donante.

20 De acuerdo con otra realización, las células hematopoyéticas inmaduras y el órgano/tejido sólido u órganos/tejidos se obtienen de diferentes donantes (no singénicos).

De acuerdo con una realización, las células hematopoyéticas inmaduras se trasplantan antes de, simultáneamente con o después del trasplante del órgano sólido.

25 De acuerdo con una realización, se induce en primer lugar quimerismo hematopoyético en el sujeto por trasplante de células hematopoyéticas inmaduras junto con las células Tcm de la presente invención, lo que conduce a tolerancia de otros tejidos/órganos trasplantados del mismo donante.

30 De acuerdo con una realización, las células Tcm de la presente invención se usan por sí mismas para reducción de rechazo de tejidos/órganos trasplantados del mismo donante.

En una realización adicional, el trasplante celular o tisular y la población aislada de células proceden del mismo donante.

35 En una realización adicional, el trasplante celular o tisular es singénico con el sujeto y la población aislada de células no son singénicas con el sujeto.

En una realización adicional, el trasplante celular o tisular es singénico con el sujeto y la población aislada de células son singénicas con el sujeto.

40 Después de realizar el trasplante celular o tisular en el sujeto de acuerdo con las presentes enseñanzas, es conveniente, de acuerdo con la práctica médica convencional, supervisar la funcionalidad del crecimiento y la inmunocompatibilidad del órgano de acuerdo con una cualquiera de diversas técnicas convencionales en este campo. Por ejemplo, la funcionalidad de un trasplante de tejido pancreático puede supervisarse después de trasplante mediante ensayos de función pancreática convencionales (por ejemplo análisis de niveles en suero de insulina). De forma similar, un trasplante de tejido hepático puede supervisarse después de trasplante por ensayos de función hepática convencionales (por ejemplo análisis de niveles en suero de albúmina, proteína total, ALT, AST y bilirrubina y análisis de tiempo de coagulación sanguínea). El desarrollo estructural de las células o tejidos puede supervisarse mediante tomografía computarizada o captura de imágenes por ultrasonidos.

45 Dependiendo del contexto del trasplante, para facilitar el injerto del trasplante celular o tisular, el método puede comprender además provechosamente acondicionar al sujeto en condiciones subletales, letales o supraletales antes del trasplante.

55 Como se usa en el presente documento, los términos “subletal”, “letal” y “supraletal”, en relación con el acondicionamiento de sujetos de la presente invención, se refieren a tratamientos mielotóxicos y/o linfocitotóxicos que, cuando se aplican a una población representativa de los sujetos, respectivamente, son típicamente: no letales para esencialmente todos los miembros de la población; letales para algunos pero no todos los miembros de la población; o letales para esencialmente todos los miembros de la población en condiciones normales de esterilidad.

60 De acuerdo con una realización, la etapa de acondicionamiento se efectúa acondicionando al sujeto en condiciones supraletales, tal como en condiciones mieloablativas.

65 Como alternativa, la etapa acondicionante puede efectuarse acondicionando al sujeto en condiciones letales o subletales, tal como acondicionando al sujeto en condiciones mielorreductoras.

Los ejemplos de agentes acondicionantes que pueden usarse para acondicionar al sujeto incluyen, sin limitación, irradiación, agentes farmacológicos y células inductoras de tolerancia (como se describe en el presente documento).

- 5 Los ejemplos de agentes farmacológicos incluyen fármacos mielotóxicos, fármacos linfocitotóxicos y fármacos inmunosupresores.

Los ejemplos de fármacos mielotóxicos incluyen, sin limitación, busulfán, dimetil milerano, melfalán y tiotepa.

- 10 El método puede comprender además provechosamente acondicionar al sujeto con un régimen inmunosupresor antes de, simultáneamente con o después del trasplante celular o tisular.

- 15 Los ejemplos de tipos adecuados de regímenes inmunosupresores incluyen la administración de fármacos inmunosupresores, poblaciones celulares inductoras de tolerancia (como se describe en detalle posteriormente en el presente documento) y/o irradiación inmunosupresora.

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

- 25 Preferentemente, el régimen inmunosupresor consiste en administrar al menos un agente inmunosupresor al sujeto.

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

- 35 Independientemente del tipo de trasplante, para evitar el rechazo de injertos y enfermedad de injerto contra hospedador, el método de la presente invención utiliza las nuevas células Tcm antiterceros (como se ha descrito en detalle anteriormente en el presente documento).

- 40 De acuerdo con el método de la presente invención, estas células Tcm antiterceros se administran simultáneamente con, antes de o después del trasplante celular o tisular.

- 45 Las células Tcm antiterceros pueden administrarse por cualquier método conocido en la técnica para trasplante celular, tal como pero sin limitación, infusión celular (por ejemplo I.V.) o mediante una vía intraperitoneal.

- 50 Sin quedar ligado a la teoría, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de células Tcm antiterceros eficaz para obtener tolerancia, efecto antitumoral y/o reconstitución inmunitaria sin inducir GVHD. Ya que las células Tcm de la presente invención se dirigen a los ganglios linfáticos después de trasplante, pueden ser necesarias cantidades menores de células (en comparación con la dosis de células previamente usada, véase por ejemplo el documento WO 2001/049243) para conseguir el efecto o los efectos beneficiosos de las células (por ejemplo obtención de tolerancia, efecto antitumoral y/o reconstitución inmunitaria). Se apreciará que pueden ser necesarios niveles menores de fármacos inmunosupresores junto con las células Tcm de la presente invención (tal como exclusión de rapamicina del protocolo terapéutico).

- 55 La determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

- 60 Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o un título deseado. Dicha información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos.

- 65 Por ejemplo, en el caso del trasplante tisular el número de células Tcm antiterceros infundidas en un receptor debería ser mayor de 1×10^4 /Kg de peso corporal. el número de células Tcm antiterceros infundidas a un receptor debería estar típicamente en el intervalo de 1×10^3 /Kg de peso corporal a 1×10^4 /Kg de peso corporal, el intervalo de 1×10^4 /Kg de peso corporal a 1×10^5 /Kg de peso corporal, el intervalo de 1×10^4 /Kg de peso corporal a $1 \times$

5 10^6 /Kg de peso corporal, el intervalo de 1×10^4 /Kg de peso corporal a 1×10^7 /Kg de peso corporal, el intervalo de 1×10^4 /Kg de peso corporal a 1×10^8 /Kg de peso corporal, el intervalo de 1×10^3 /Kg de peso corporal a 1×10^5 /Kg de peso corporal, el intervalo de 1×10^4 /Kg de peso corporal a 1×10^6 /Kg de peso corporal, el intervalo de 1×10^5 /Kg de peso corporal a 1×10^7 /Kg de peso corporal, el intervalo de 1×10^6 /Kg de peso corporal a 1×10^8 /Kg de peso corporal. De acuerdo con una realización específica, el número de células Tcm antiterceros infundidas en un receptor debería estar en el intervalo de 1×10^5 /Kg de peso corporal a 1×10^7 /Kg de peso corporal.

10 Por lo tanto, las nuevas células Tcm antiterceros de la presente invención pueden usarse como terapia adyuvante para un trasplante celular o tisular (como se ha descrito anteriormente en el presente documento). Además, las nuevas células Tcm de la presente invención también están dotadas de actividad antienfermedad (por ejemplo actividad anticélulas tumorales, como se ha descrito en más detalle anteriormente en el presente documento) y por lo tanto pueden usarse por sí mismas para tratamiento de enfermedad.

15 De acuerdo con una realización específica, para obtener una actividad de injerto contra células enfermas (por ejemplo efecto antitumoral tal como tratamiento antileucemia), pueden usarse células singénicas así como células no singénicas.

20 Por lo tanto, el método de la presente invención puede aplicarse para tratar cualquier enfermedad tal como, pero sin limitación, una enfermedad maligna, una enfermedad asociada con trasplante de un injerto, una enfermedad infecciosa tal como una enfermedad vírica o una enfermedad bacteriana, una enfermedad inflamatoria y/o una enfermedad autoinmunitaria.

25 Las enfermedades que pueden tratarse usando los métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, enfermedades malignas tales como leucemia [por ejemplo, linfática aguda, linfoblástica aguda, de células pre B linfoblástica aguda, leucemia de células T linfoblástica aguda, megacarioblástica aguda, monocítica, mielógena aguda, mielóide aguda, mielóide aguda con eosinofilia, de células B, basófila, mielóide crónica, crónica, de células B, eosinófila, Friend, granulocítica o mielocítica, de células pilosas, linfocítica, megacarioblástica, monocítica, monocítica-macrófagos, mieloblástica, mielóide, mielomonocítica, de células plasmáticas, de células pre B, promielocítica, subaguda, de células T, neoplasia linfoide, predisposición a tumor maligno mielóide, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica aguda de células T (LLA-T) y leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B)], linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, de células B, de Burkitt, de células T cutáneo, histiocítico, linfoblástico, de células T, tímico), carcinoma, blastoma y sarcoma; enfermedades asociadas con trasplante de un injerto (por ejemplo rechazo de injertos, rechazo de injerto crónico, rechazo de injerto subagudo, rechazo de injerto hiperagudo, rechazo de injerto agudo y enfermedad de injerto contra hospedador); enfermedades infecciosas incluyendo, pero sin limitación, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades víricas (por ejemplo VEB, CMV, VIH), enfermedades bacterianas, enfermedades protozoarias, enfermedades parasitarias, enfermedades fúngicas, enfermedades por micoplasma y enfermedades priónicas; enfermedades inflamatorias (por ejemplo enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades inflamatorias agudas); y enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumatoides, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades de tejido conectivo y enfermedades sistémicas.

45 Por lo tanto, el método de la presente invención puede aplicarse provechosamente además para tratar una enfermedad en un sujeto facilitando al mismo tiempo de forma simultánea el injerto de un trasplante de células o tejidos singénicos con las células Tcm antiterceros (por ejemplo situaciones en las que el trasplante celular o tisular y las células antiterceros proceden del mismo donante).

50 Como se usa en el presente documento el término “aproximadamente” se refiere a $\pm 10\%$.

Las expresiones “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “incluyendo pero sin limitación”.

55 La expresión “que consiste en” significa “incluyendo y limitado a”.

60 La expresión “que consiste esencialmente en” significa que la composición, el método o la estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solamente si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, el método o la estructura reivindicados.

65 Como se usa en el presente documento, la forma singular “un”, “uno(a)”, “el” y “la”, incluyen referencias plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. Por ejemplo, la expresión “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de la presente solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de la presente invención en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. En consecuencia, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha desvelado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo 1,2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que se indique en el presente documento un intervalo numérico, se entiende que incluye cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en el presente documento indistintamente y se entiende que incluyen el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionales e integrales entre medias.

Como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a maneras, modos, técnicas y procedimientos para realizar una tarea dada, incluyendo, pero sin limitación, las maneras, los modos, las técnicas y los procedimientos conocidos, o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por practicantes de la técnica química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, para más claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, también pueden proporcionarse diversos elementos de la invención, que se describen, para mayor brevedad, en el contexto de una única realización, por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertos elementos descritos en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse elementos esenciales de esas realizaciones, a no ser que la realización sea inoperante sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención según se ha delineado anteriormente en el presente documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones posterior encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

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

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

Materiales generales y procedimientos experimentales

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se aislaron PBMC de sangre completa de pacientes y de voluntarios sanos por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Cuando se indica las células se tipificaron para HLA de clase I por métodos serológicos como se ha descrito previamente [Manual of Tissue Typing Techniques. Washington DC, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, publicación de NIH DHEW 76-545, 1976, p 22].

Revestimientos celulares tumorales

Se usaron células transfectantes H.My2 C1R HLA A2 K66A y la línea de células B transfectante H.My2 C1R HLA A2 w.t.

Se usó C1R, una línea linfoblastoide de células B humana que carece de antígenos de HLA A y B en superficie, procedente de Hmy.2 B-LCL por irradiación gamma seguida de selección para anticuerpos monoclonales de clase I y complemento como se ha descrito previamente [Storkus WJ, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86: 2361-2364].

Se usó C1R-neo, una línea celular transfectante estable establecida en 1987 por electroporación de la línea celular C1R con un vector eucariota resistente a fármaco de neomicina modificado, pSP65-Neo (el vector no portaba un inserto), como se ha descrito previamente [Grumet FC, *et al.* Hum. Immunol. (1994) 40: 228-234].

Generación de células dendríticas

Se aislaron monocitos por adherencia a plástico y se cultivaron en placas de 6 pocillos usando 3 ml de medio de CD Cellgro complementado con suero humano 1% y penicilina/estreptomocina más GM-CSF (800 UI/ml) e IL-4 (20 ng/ml) (PeproTech, Hamburgo, Alemania). Después de 48 h de cultivo, se añadieron 1,5 ml de medio (+GM-CSF a 1600 UI/ml e IL4 a 20 ng/ml). 24 h después, se recogieron células no adherentes, y se contaron células grandes (la mayoría CD inmaduras), se resuspendieron en medio nuevo que contenía GM-CSF 800 UI/ml, IL-4 20 ng/ml, LPS de *E. coli* O55:B5 a 10 ng/ml (Sigma, Deisenhofen, Alemania) e IFN γ (PeproTech, 100 UI/ml) y se sembraron en placas a aproximadamente 106 CD por pocillo en 2 ml y se incubaron durante una noche. Al día siguiente, se descartaron las células no adherentes y las CD adherentes se retiraron suavemente usando PBS frío/HS 1% después de incubación en hielo durante 20 minutos. Se contaron células grandes que consistían en CD maduras. Las células se irradiaron con 30 Gy para evitar el crecimiento de algunas células T de memoria o NK potencialmente contaminantes y se usaron después para estimulación de células T.

Aislamiento de células T CD8 sin tratamiento a partir de PBMC

Se aislaron células T CD8 sin tratamiento previo por selección negativa inicial usando un kit de selección CD8 negativo (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se agotaron después las células T CD8+ expuestas a antígeno usando perlas CD45RO y en columna LD.

Generación de células T CD8 humanas de memoria central antiterceros

Se aislaron células T CD8 sin tratamiento previo y se resuspendieron en medio de células T complementado con IL-21 (PeproTech, 30 ng/ml). Se añadieron CD irradiadas a una relación CD:células T 1:4 con 4×10^5 células T por pocillo de una placa de 48 pocillos. El volumen total de cada pocillo fue de 500 μ l.

72 h después del inicio del cultivo, se añadieron 500 μ l de medio de células T con IL-7 e IL-15 (PeproTech, concentraciones finales de 5 ng/ml) y las células se alimentaron posteriormente cada 2-3 días como se perfila en la sección de resultados.

Ensayo de GVL

Se obtuvieron células de la línea de linfoblastos B transfectante mutante H.My C1R ("Neo") y H.My C1R HLA A2 K66A ("K66A") mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll y se marcaron con calceínaAM 0,15 μ g/ml (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR), un colorante vital que se libera tras la muerte celular, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se incubaron 2×10^5 células de la línea de linfoblastos B marcada con calceína con o sin Tcm antiterceros durante 22 horas a una relación 1 a 5 en favor de Tcm antiterceros en placas de 24 pocillos. Antes del cocultivo las Tcm antiterceros se enriquecieron con respecto a células T CD8+ por un kit de selección negativa (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). No se añadió ninguna citocina exógena a la RLM. Las células se recuperaron y analizaron con respecto a supervivencia midiendo el número de células de línea de linfoblastos B teñidas con calceína supervivientes por FACS. Para la detección de apoptosis mediante anexinaV+ se incubaron muestras con 5 μ l de anexinaV-APC (BD) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró por lavado anexinaV no unida y las muestras se analizaron mediante FACS. Para obtener valores absolutos de células, las muestras se suspendieron en un volumen constante y se obtuvieron recuentos citométricos de flujo para cada muestra durante un periodo de tiempo predeterminado, constante, y se compararon

con recuentos citométricos de flujo obtenidos con volumen fijo y números fijos de células de aporte. La tasa de supervivencia se presenta en relación con la supervivencia de células de línea de linfoblastos B solamente.

El porcentaje de células de línea de linfoblastos B muertas se calculó por la siguiente fórmula:

5

$$\left(1 - \frac{\text{El número de células de línea de linfoblastos B vivas en el pocillo evaluado}}{\text{El número de células de línea de linfoblastos B vivas en el pocillo de control}} \right) \times 100$$

El porcentaje de células de línea de linfoblastos B que experimentan apoptosis específica se calculó por la siguiente fórmula: = (% de células de línea de linfoblastos B calceína+anexinaV+ en el pocillo evaluado) - (% de células de línea de linfoblastos B calceína+anexinaV+ en el pocillo de control).

10

Un enfoque de clasificación magnética de dos estadios para agotamiento de alorreactividad, basándose en el marcador de activación de CD137

15 Se estimularon células T CD8 sin tratamiento previo con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 6:1 en presencia de IL-21 (Peprotech, 30 ng/ml). Después de 14 horas de activación, Las células CD137+ se seleccionaron positivamente por clasificación magnética (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células CD137+ se volvieron a estimular después con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 (Peprotech, 30 ng/ml) hasta el día 3. A continuación, las células se expandieron con IL-7 5 ng/ml e IL-15 5 ng/ml (Peprotech) hasta el día 10. El día 10, las células se dividieron en dos grupos de ensayo. En el primer grupo las células continuaron expandiéndose con IL-7 e IL-15 hasta el día 14, mientras que las células en el segundo grupo de ensayo se activaron con PBMC hospedadoras irradiadas en presencia de IL-7 e IL-15 (a una relación de 1 a 2). Después de 24 h, las células CD137+ se agotaron por clasificación magnética. Las células con agotamiento de CD137 se volvieron a sembrar en placas con IL-7 e IL-15 y se cultivaron hasta el día 14 ("CD137+ antiterceros y CD137- anti hospedadores"). El día 14, se evaluó la alorreactividad antiterceros y antihospedadores por ensayo de CFSE contra terceras PBMC o PBMC hospedadoras irradiadas. Para el ensayo de CFSE, se incubaron 1×10^6 células reactivas CFSE+ con o sin 2×10^6 estimulantes PBMC irradiadas (20 Gy) durante 84 h en presencia de IL-7. Después de 84 h, las células se recuperaron y se analizaron con respecto a división celular midiendo el número de células T CD8 con baja tinción de CFSE (CD3+CD8+CD56-) por FACS. Para obtener valores absolutos de células, las muestras se suspendieron en un volumen constante y se obtuvieron recuentos citométricos de flujo para cada muestra durante un periodo predeterminado, constante. El número de células en división específicas = (el número de células en división con APC) - (el número de células en división sin APC). Los valores negativos significan que el número de células en división en respuesta a activación con PBMC hospedadoras fue incluso más bajo que el número de células en división sin ninguna activación.

25

30

35

Ejemplo 1

Generación y optimización de células T centrales de memoria (Tcm) antiterceros humanas

40 Para trasladar los estudios de ratones previamente presentados a aplicación clínica, el procedimiento se optimizó para generar linfocitos T citotóxicos (CTL) humanos antiterceros. Para ese fin, se evaluaron diferentes parámetros incluyendo diferentes reactivos para el aislamiento de células reactivas CD8, la composición de los estimulantes y el medio de citocinas.

45 Posiblemente, como se ha descubierto en el modelo de ratón previamente presentado, el tratamiento con células T de memoria central (Tcm) podría ser valioso en el contexto de trasplante de médula ósea autólogo [Lask A *et al.*, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), (2010) 116: 424] o alogénico (TMO) [Ophir E *et al.*, Blood. (2010) 115(10): 2095-104; Ophir E., 37º encuentro anual de la EBMT, 3-6 de abril de 2011, París, Francia. Resumen de la presentación oral N.º 662].

50

En el entorno autólogo humano (Figura 1A) pueden administrarse Tcm antiterceros junto con TMO autólogo. Las células T CD8+ propias del paciente se aíslan y se estimulan contra células dendríticas alogénicas de un donante alogénico.

55 En el entorno alogénico humano (Figura 1B), pueden trasplantarse Tcm antiterceros junto con células de la MO con agotamiento de T alogénicas. Las células T CD8+ sin tratamiento previo que se originan del donante de MO alogénico actúan como células reactivas y se usan terceras células dendríticas donantes para permitir la generación de Tcm no reactivos hospedadores. Para evitar la GVHD, el tercer donante se selecciona para asegurar que ninguno de estos alelos del HLA de clase I esté compartido con los alelos del HLA de clase I del hospedador.

60

Aunque tanto en ratones como en seres humanos, el protocolo básico previsto comprendía de forma similar aislamiento de células T CD8 seguido de estimulación contra terceras células (Figuras 1A-B y 2A-B), hubo que modificar varios otros parámetros en el protocolo humano, como se perfila en la Tabla 1, a continuación.

5 Teniendo en cuenta que los Tcm autólogos están libres de riesgo de GVHD, la optimización del protocolo de producción se concentró en gran medida en obtener una expansión eficaz de células T CD8 antiterceros con fenotipo de memoria central.

10 Como puede verse en la Figura 3A, se desarrolló un nuevo protocolo basándose en tres etapas principales: a) selección de células T CD8 a partir de PBMC; b) estimulación contra células dendríticas (CD) alogénicas durante 3 días en presencia de IL-21; y c) expansión en un ambiente sin antígenos con IL-7, IL-15 e IL-21 durante 8 días adicionales.

15 Por lo tanto, en este protocolo recién desarrollado diversos parámetros difieren del usado para la generación de Tcm de ratón (Tabla 1 y Figuras 3A-B). Las principales diferencias se refieren al tejido de origen para las células reactivas y estimulantes (PBMC frente a esplenocitos), las células estimulantes (células dendríticas frente a esplenocitos), así como la composición de citocinas.

Tabla 1: Comparación de protocolo humano autólogo frente al protocolo de ratón singénico para la generación de Tcm

Ser humano	Ratón	Parámetros	Estadios principales
PBMC congeladas	Esplenocitos nuevos	Tejido de origen	Células reactivas
SÍ	NO	Agotamiento de células adheridas (Adherencia en plástico durante una noche + IL-7)	
SÍ	NO	Agotamiento de células CD4+, CD56+	
Células T CD8+	Esplenocitos completos	Composición celular final antes del cocultivo con células estimulantes	
Ser humano	Ratón	Parámetros	Estadios principales
PBMC congeladas	Esplenocitos nuevos	Tejido de origen	Terceras células estimulantes
SÍ	NO	Generación de células dendríticas maduras derivadas de monocitos	
Células dendríticas	Esplenocitos completos	Composición celular final antes del cocultivo con células sensibles	
Ser humano	Ratón	Parámetros	Estadios principales
Células T CD8+ → CD irradiadas	Esplenocitos → esplenocitos irradiados	Composición celular	Cocultivo: (sensibilización)
3 días	2,5 días	Duración del cocultivo	
D0: se añade IL-21.	Sin citocinas	Citocinas	
Se transfieren células no adherentes a una nueva placa	Selección CD8+ positiva, de Ficoll, y siembra en un nuevo matraz.	El cocultivo se detuvo por:	
IL-7, IL-15, IL-21	IL-15	Citocinas	Expansión sin antígenos
NO	SÍ	Selección positiva de células CD62L+ al final del cultivo	

20 *Optimización de un protocolo de uso en GMP para la generación de Tcm humanos antiterceros:*

25 Los intentos iniciales de desarrollar un protocolo humano para la generación de Tcm antiterceros se basó en un estudio reciente de Wolff *et al.* [Wolff M *et al.*, Cancer Immunol Immunother (2011) 60(2): 173-186], que describía un procedimiento para la generación de células T CD8 específicas de antígeno humano con un fenotipo de memoria central.

30 El presente enfoque se basó en la estimulación contra CD con pulsos de antígenos en presencia de IL-21 durante 3 días y posterior expansión en presencia de IL-7 e IL-15 durante 8 días adicionales.

En estos experimentos iniciales que dieron como resultado una expansión notable de Tcm antiterceros y sirvieron posteriormente como referencia para optimización adicional, se usaron las siguientes etapas: a) enriquecimiento de células T CD8 a partir de PBMC mediante agotamiento de células no CD8+. (es decir, células T CD4+, células T γ/δ ,

células B, células NK, células dendríticas, monocitos, granulocitos y células eritroides); b) enriquecimiento de células sin tratamiento previo mediante agotamiento de células activadas que expresan CD45RO; y c) estimulación de células T CD8 sin tratamiento previo contra células dendríticas alogénicas en presencia de IL-21 durante 3 días seguido de expansión en un ambiente sin antígenos con IL-7 e IL-15 durante 8 días adicionales.

5 Los resultados de estos experimentos de referencia iniciales, mostrados en las Figuras 4A-C, permitieron la evaluación del papel de diferentes parámetros en el protocolo, definiendo la influencia de cada parámetro en el nivel de expansión celular y nivel de expresión de fenotipo Tcm (como se describe en detalle posteriormente).

10 *El papel de la sensibilización con terceras CD*

Teniendo en cuenta que las Tcm autólogas están libres de riesgo de GVHD por definición, el primer parámetro evaluado fue el papel de la estimulación contra una tercera CD. Se pretendía originalmente que esta etapa redujera el riesgo de GVHD en el entorno alogénico, mediante expansión selectiva de clones antiterceros en ausencia de estimulación de clones antihospedador que median en GVHD.

15 Como se ilustra en las Figuras 5A-C y 6A-B, las células T CD8 sin tratamiento previo cultivadas con IL-21 en ausencia de estimulación alogénica por células dendríticas mostraron bajo nivel de proliferación ($2,7 \pm 1,1$ % del mostrado por el grupo de control de referencia), que representa el día 7 aproximadamente una expansión de 0,4 veces desde el día 0 (la mayoría de las células murieron antes del día 10) y que mantuvieron su fenotipo sin tratamiento previo (CD45RO-CD62L+, morfología pequeña) (el nivel de Tcm fue solamente 10 % de el del grupo de control de referencia). Se descubrió un nivel de diferenciación y expansión similarmente bajo cuando las células se mantuvieron con IL-7 e IL-15 en ausencia de estimulación alogénica por células dendríticas; en estas condiciones, las células mantuvieron su fenotipo sin tratamiento previo (el nivel de Tcm fue solamente de $7 \pm 1,6$ % de el del grupo de control de referencia), aunque se indujo algo de proliferación ($12 \pm 3,2$ % del valor del grupo de control, que representa el día 13 aproximadamente una expansión de 6 veces desde el día 0). Por lo tanto, el papel de terceras CD alogénicas fue muy crítico para la inducción del fenotipo de Tcm y para expansión celular robusta.

30 *El papel de IL-21 en las fases de sensibilización y expansión de Tcm antiterceros*

En general, en protocolos de expansión de células T convencionales, tanto en ratón como en ser humano, la fase de expansión se realiza en ambiente sin antígenos. Sin embargo, aunque en el protocolo de ratón, solamente se añade IL-15 (Figura 3B), en el protocolo humano descrito en Wolff *et al.* (Wolff *et al.* 2011, mencionado anteriormente), se realiza expansión celular en presencia de IL-7 e IL-15. Además, teniendo en cuenta que se mostró que IL-21 era beneficiosa si se añadía durante la fase de sensibilización inicial, se evaluó en el presente documento el papel de IL-21.

40 Resulta interesante que, como se muestra en las Figuras 7A-C y 8A-B, mientras que la sensibilización de células T CD8 sin tratamiento previo mediante CD alogénicas en presencia o ausencia de IL-21 tuvo solamente efectos menores en la composición celular (datos no mostrados), la sensibilización en ausencia de IL-21 dificultó la adquisición de fenotipo Tcm (CD45RO+CD62L+) (solamente 69 ± 18 % del nivel de Tcm en el grupo de control de referencia) y también dio como resultado reducción de la proliferación (76 ± 23 % del nivel de expansión en el grupo de control de referencia) (Figuras 8A-B). Incluso en el único experimento de cuatro en el que no se redujo la expansión (140 % del grupo de control de referencia), el fenotipo Tcm fue solamente el 35 % del nivel de Tcm en el grupo de control de referencia, lo que sugiere que la sensibilización en presencia de IL-21 es importante tanto para la expansión como para la inducción de fenotipo Tcm de la población de células T CD8 sin tratamiento previo.

50 Resulta interesante que la presencia continua de IL-21 tanto en la fase de sensibilización (IL-21 solamente) como en la fase de expansión (junto con IL-7 e IL-15) mejoró uniformemente la inducción de células del fenotipo de memoria central ($108 \pm 1,9$ % del nivel de Tcm en el grupo de control de referencia) (Figuras 7A-C y 8A-B). La influencia de la presencia continuada de IL-21 en expansión celular, aunque conduce claramente a mayor aumento promedio (135 ± 47 % de los valores hallados en el grupo de control de referencia) fue menos uniforme, conduciendo en dos de tres experimentos a una expansión ligeramente reducida (95 % y 81 % de los valores de referencia respectivamente), mientras que en el tercer experimento, mostraba una expansión drásticamente potenciada (228 %), lo que indica que la adición de IL-21 en las fases tanto de sensibilización como de expansión podría ser deseable (Figuras 8A-B).

60 *Composición de las terceras células estimulantes*

Los resultados descritos anteriormente muestran que la adición secuencial de IL-21, IL-7 e IL-15 debe estar acompañada de estimulación alogénica por CD maduras derivadas de monocitos para la inducción exitosa de fenotipo de Tcm y para expansión celular robusta.

65 Para simplificar el procedimiento, se llevó a cabo un experimento para evaluar si la estimulación alogénica esencial podría suministrarse por PBMC irradiadas en lugar de CD maduras derivadas de monocitos que requiere una preparación de 4 días.

5 Como puede verse en la Tabla 2 a continuación, a los 7 días de cultivo, la eficacia de inducción de fenotipo Tcm por PBMC, a diferencia de CD maduras derivadas de monocitos (CDm-dm), las células estimulantes fueron muy similares, cuando las células T CD8 sin tratamiento previo purificadas (92 % frente a 92 %, respectivamente) así como cuando las células T CD8 no separadas actuaron como células sensibles (77 % frente a 80 %). Sin embargo, las células estimulantes PBMC no fueron capaces de inducir el mismo nivel de expansión de Tcm en comparación con CD usando células T CD8 sin tratamiento previo (6,75 frente a 20,5, respectivamente) o células T CD8 no separadas (1,8 frente a 16) como células sensibles.

Tabla 2: El papel crítico de las CD como estimulantes

% de Tcm (CD3+CD8+CD62L+CD45RA-)	Factor de expansión desde el día 0 (el día 7)	Grupo
92	20,5	Células T CD8 sin tratamiento previo → (CDm-dm)
92	6,75	Células T CD8 sin tratamiento previo → PBMC
80	16	Células T CD8 no separadas → (CDm-dm)
77	1,8	Células T CD8 no separadas → PBMC

El cultivo de RLM en el que se estimularon células T CD8 sin tratamiento previo o células sensibles T CD8 no separadas contra CD maduras derivadas de monocitos (relación de células sensibles/CD 8:1) o PBMC (relación de células sensibles/PBMC 1:1), del mismo donante alogénico, en un medio que contenía IL-21 durante 3 días. A continuación, las células se cultivaron con IL-7 e IL-15 hasta el día 7 sin activación adicional. El día 7 del cultivo, los diferentes grupos se evaluaron con respecto al porcentaje de Tcm usando análisis de FACS y con respecto a números de células por exclusión con azul de tripano.

10 Por lo tanto, a diferencia del protocolo de ratón en el que los esplenocitos irradiados fueron suficientes para inducir la expansión, en el protocolo humano, las CD maduras derivadas de monocitos alogénicos son cruciales para la buena expansión de células Tcm y no pueden reemplazarse por PBMC alogénicas.

15 *Definición de la relación de células sensibles/CD óptima para la inducción de fenotipo Tcm y expansión celular.*

Para definir la relación de células sensibles/CD óptima, se usó un sistema de RLM, como se ha descrito anteriormente, excepto que se ensayaron diferentes relaciones de células sensibles/CD. Como puede verse en las Figuras 9A-B, cuando se usan 4×10^5 células sensibles, se obtuvo una adquisición óptima de fenotipo Tcm tras la adición de $50-100 \times 10^3$ CD, mientras que la expansión fue óptima a la menor concentración de CD. Se examinan experimentos adicionales a relaciones de células sensibles/CD menores.

Definición de un protocolo autólogo final basado exclusivamente en reactivos de uso en GMP.

25 Tras el establecimiento de un protocolo autólogo satisfactorio para la generación de Tcm antiterceros, se llevó a cabo un experimento para desarrollar un procedimiento equivalente basándose solamente en reactivos de uso en GMP disponibles actualmente en el mercado para permitir el ensayo de este enfoque en pacientes humanos.

Agotamiento de células adherentes en placas de plástico.

30 Antes de optimizar el proceso de selección de células T CD8, se llevó a cabo un experimento para obtener un enriquecimiento inicial significativo mediante la retirada de células adherentes en plástico presentes en PBMC. Este proceso no solamente aumenta la concentración de las células T CD8+ deseadas sino que también es útil cuando se procesan PBMC humanas crioconservadas a diferencia de esplenocitos nuevos usados en el modelo de ratón. Este experimento reveló que la incubación durante una noche con suero humano al 10 % e IL-7 permitió que las células descongeladas se recuperaran antes de someterse al proceso de enriquecimiento magnético (datos no mostrados).

Enriquecimiento de células T CD8 sin tratamiento previo

40 A continuación, la atención se centró en la adaptación del enriquecimiento de células T CD8 sin tratamiento previo a reactivos de uso clínico usando tan pocos anticuerpos como fuera posible.

45 Como se muestra en la Figura 10, que representa un experimento típico, la población deseada de células T CD8 representa el 21 % de las células el día 0 después del agotamiento de células adheridas, mientras que las otras subpoblaciones "contaminantes" principales incluyen células T CD4 (61 %), células B (7 %) y células NK (7 %). Por lo tanto, las células CD4 representan la mayor contaminación, y se ha mostrado previamente que compiten con células T CD8; por lo tanto hubo que retirar estas células. De forma similar, fue importante retirar células NK que se sabe que se expanden en cultivos de IL-15. Por el contrario, las células B tienden a morir en estas condiciones de

cultivo. Por lo tanto, el agotamiento potencial con perlas magnéticas anti-CD4 y anti-CD56 se evaluó inicialmente con y sin agotamiento de células B CD 19+.

5 Además, ya que en las PBMC de pacientes con tumores malignos de células B, los niveles de células T CD8 son menores en comparación con donantes sanos, se llevó a cabo una evaluación paralela que examinaba la posibilidad de omitir el enriquecimiento de células T CD8 sin tratamiento previo mediante selección positiva de células CD45RA+, ya que reduce adicionalmente el número de células T CD8 recuperadas.

10 Por lo tanto, el día -1 se agotaron en primer lugar las células adherentes de PBMC donantes mediante incubación durante una noche en placas de cultivo tisular CELLSTAR greiner-bio-one (Greiner Bio-One Ltd., Stonehouse Reino Unido), diseñadas específicamente para retirar células mieloides adherentes y el día 0 las células no adherentes se dividieron en cuatro grupos experimentales, cada uno sometido a un protocolo de clasificación magnética diferente. Los días 0, 7, 10 y 14 de cultivo, las células se evaluaron con respecto a composición celular y fenotipo de Tcm por análisis de FACS y con respecto a expansión contando células vivas basándose en exclusión con azul de tripano.

15 Como puede verse en la Figura 10, la clasificación celular magnética mínima usando solamente perlas anti CD4 y anti CD56, redujo el porcentaje de células T CD4 y NK del 61 % y el 7 % al 12 % y el 1 %, respectivamente, dando como resultado enriquecimiento de células T CD8 del 23 % al 60 %. Sin embargo, este procedimiento se asoció con potenciación de los niveles de células B del 7 % al 24 %. La adición de anti CD19 al cóctel de agotamiento agotó completamente las células B, dando como resultado enriquecimiento mejorado de células T CD8 (90 %). La adición de una segunda etapa de enriquecimiento positivo de células sin tratamiento previo con anti CD45RA aumentó el porcentaje de células sin tratamiento previo (CD45RO-CD45RA+, seleccionadas en CD3+CD8+) del 53 % antes de la clasificación magnética al 91 % en ambos grupos. Sin embargo, esta etapa no afectó notablemente al nivel final de células T CD8, que aumentó del 60 % al 66 % cuando se usó anti CD4 y anti CD56, o del 90 % al 94 % cuando la etapa de selección negativa también incluyó anti CD19.

20 Después de la clasificación celular magnética, los cuatro grupos de sensibilizaron con células dendríticas alogénicas en presencia de IL-21 durante 3 días, y a continuación las células se expandieron en un ambiente sin antígenos hasta el día 14, en presencia de IL-21, IL-7, e IL-15. Como grupo de control para células no expandidas, las células T CD8 sin tratamiento previo enriquecidas por una etapa de agotamiento usando anti CD4, anti CD56 y anti CD19 y una etapa de enriquecimiento positiva usando anti CD45RA, se mantuvieron en un ambiente sin antígenos en presencia de solamente IL-7 hasta el día 14.

30 Resulta interesante que, aunque el día 0 los grupos tratados o no tratados con anti CD19 mostraron niveles notablemente diferentes de células T CD8, esta diferencia se anuló tan pronto como el día 7 (Figura 11), y también cuando se ensayó el día 14 (Figura 12), probablemente debido a muerte selectiva de células B en el cultivo. De forma similar, la selección positiva de células CD45RA+ después de la purificación de células T CD8 inicial solamente contribuyó marginalmente al enriquecimiento final de células T CD8+ con un fenotipo Tcm. Por lo tanto, los cuatro grupos mostraron niveles similares de las células deseadas con una ventaja menor para los dos grupos también enriquecidos con respecto a células sin tratamiento previo mediante anti CD45RA.

35 Este resultado inicial mostrado anteriormente en un experimento típico se analizó adicionalmente comparando resultados promedio obtenidos en el grupo de control expuesto a reactivos de aislamiento celular óptimos ("CD4-CD56- CD19-, CD45RA+") con los otros grupos en los que se realizó un intento de eliminar el uso de anti CD19 o anti CD45RA.

40 Por lo tanto, el porcentaje promedio de células T CD8 (Figura 13A), y lo que es más importante, el porcentaje de Tcm (Figura 13B) en todos los grupos experimentales cuando se calculó como un porcentaje del nivel obtenido en el grupo de control óptimo fueron muy similares.

45 Por el contrario, se encontraron diferencias notables en la expresión promedio de cada preparación celular cuando se ensayaron el día 10 de cultivo, que variaba del $65,6 \pm 0,5$ % al $105,2 \pm 6,8$ % (Figura 14A). Sin embargo, las diferencias en la capacidad de expansión se contrarrestaron por el rendimiento reducido asociado con la segunda etapa de purificación (Figura 14B).

50 Como puede verse en la Figura 14C, que muestra el rendimiento calculado final de Tcm el día 10, la adición de una segunda etapa de enriquecimiento positivo de células sin tratamiento previo con anti CD45RA solamente redujo el rendimiento final de células Tcm, del 141 % al 123 %, cuando se usó agotamiento inicial con anti CD4 y anti CD56, o del 157 % al 100 %, cuando la etapa de selección negativa también incluyó anti CD19.

55 Colectivamente estos resultados sugieren que el protocolo basado en uso mínimo de reactivos para el aislamiento de células T CD8, concretamente selección negativa con anti CD4 y anti CD56, es satisfactorio para aplicación clínica en el entorno autólogo.

60

65

Ejemplo 2

Preparación a gran escala de Tcm humanos antiterceros en bolsas de plástico usando reactivos de uso en GMP

5 Para estimular las condiciones anticipadas cuando se usan PBMC propias de los pacientes para la generación de Tcm autólogos, inicialmente se realizaron dos procedimientos de leucoféresis a gran escala, dos de donantes normales y se crioconservaron un gran número de células mononucleares (divididas en varios lotes). Cada lote se usó para un experimento a gran escala. En el primer experimento, se encontraron varios problemas técnicos incluyendo dificultad en la generación de CD a partir de las bolsas congeladas de acuerdo con el protocolo de Wurzburg y la obtención de una nueva IL-15 de uso en GMP para la que la actividad biológica no estaba clara. Estos problemas, que dieron como resultado una expansión de células T CD8 muy baja (aproximadamente el triple), se corrigieron en los experimentos posteriores usando el protocolo descrito por la presente para CD (como se ha descrito anteriormente) y usando la concentración apropiada de IL-15 (es decir 300 U/ml).

10

15 Como puede verse en la Figura 15, cuando se generaron PBMC del mismo donante en dos experimentos de gran escala contra dos terceras CD diferentes, se obtuvo una expansión de células T CD8 similar que varió de 26,8 a 31,0 veces el día 11. Teniendo en cuenta que este día las células mostraron un crecimiento lineal es probable que pueda obtenerse expansión adicional en puntos temporales posteriores. Sin embargo, este nivel de expansión es satisfactorio ya que permite la administración potencial de hasta 3×10^7 células por Kg de peso corporal. Resulta interesante que, aunque el día 0 se descubrió que la preparación de leucoféresis estaba en gran medida contaminada con monocitos CD14+ y células B CD20, estas células desaparecen tras el cultivo celular y la composición celular final el día 12 comprendía células T CD8+CD3+ 94 % y 98 % respectivamente (Figuras 16A-B).

20

25 Resulta importante que el fenotipo Tcm obtenido en los dos cultivos contra diferentes CD estaba dentro del intervalo de los experimentos a pequeña escala aunque se produjo algo de variabilidad (Figuras 17A-B). Por lo tanto, aunque el día 5 en ambos experimentos se encontró alto nivel de fenotipo de Tcm (77 % y 71 %, respectivamente), este nivel se redujo más significativamente en el cultivo contra el 2º donante de CD tras el 9º día (65 % frente a 46 %) y el día 12 (62 % frente a 35 %). Esta variabilidad que no se observó significativamente en los experimentos a pequeña escala podría explicarse en parte por una dificultad relativa para retirar las CD el día 5, ya que es menos probable que se adhieran a la bolsa de plástico en comparación con su adhesión a las placas usadas en los experimentos a pequeña escala. Por lo tanto, la mayor presencia y estimulación con las CD podría conducir a una transición más pronunciada de un fenotipo Tcm con respecto a uno Teff.

30

Ejemplo 3

Potencial de GVL de los Tcm humanos antiterceros contra una línea celular establecida

35 Teniendo en cuenta que en el entorno autólogo el uso potencial de Tcm antiterceros es solamente para erradicar células tumorales residuales (en el entorno alogénico también actúa para potenciar el injerto de las células de la MO) es importante desarrollar un ensayo sencillo para la capacidad citotóxica *ex vivo* que podría usarse para control de calidad antes de la infusión del Tcm al paciente. Para este fin, se usó un ensayo independiente de TCR basado en la demostración por Lask et al. [Lask A et al., J Immunol. (2011) 187(4): 2006-14] de que una línea mutada del MHC no reconocible por TCR debido a esta mutación, aún puede ser destruida por CTL antiterceros mediante su mecanismo de destrucción independiente de TCR. Claramente, si es aplicable también para Tcm humanos, dicha modalidad de destrucción podría actuar para distinguir entre la destrucción de Tcm y la mostrada por células NK.

40

45

Para abordar esta cuestión, se llevó a cabo una reacción de linfocitos mixtos (RLM) con Tcm antiterceros que se dirigen a líneas celulares de linfoma de células B y leucemia de células plasmáticas y el porcentaje de células apoptóticas se midió después de 22 horas. Como puede verse en la Figura 17C, que representa un experimento típico, los Tcm mostraron reactividad de GVL notable.

50

En un experimento diferente, las células T CD8 se enriquecieron en primer lugar agotando exhaustivamente células no T CD8 (es decir, células T CD4+, células T γ/δ , células B, células NK, células dendríticas, monocitos, granulocitos y células eritroides) usando clasificación con perlas magnéticas. Como puede verse en la Figura 18, que representa un experimento típico, el porcentaje de células NK y NKT contaminantes fue muy bajo (por debajo del 0,1 % para células NK y por debajo de 1,9 % para células NKT) para los cuatro grupos ensayados.

55

Las células T CD8 altamente purificadas se incubaron después con dos tipos de células: a) línea celular mutante H.My C1R HLA-A2 K66A (K66A) para demostrar destrucción independiente de TCR y b) H.My C1R (Neo), una línea linfoblastoide de células B que carece de antígenos del HLA A y B en superficie y por lo tanto es insensible a destrucción por Tcm mediante un mecanismo que requiere interacción entre la molécula CD8 en el Tcm y el dominio $\alpha 3$ en MHC de las células de leucemia diana.

60

Como se muestra en las Figuras 19A-D, los Tcm antiterceros mostraron destrucción notable de las células diana mutadas K66A en comparación con las células H.My C1R (Neo) deficientes en MHC-I. Por lo tanto, los Tcm humanos de forma similar a CTL humanos antiterceros pueden destruir células tumorales de células B mediante un

65

mecanismo de destrucción independiente de TCR, a diferencia de destrucción mediada por NK que requiere expresión del MHC en las células diana.

5 Resulta más importante que, cuando se analizó adicionalmente comparando resultados promedios obtenidos en el grupo de control expuesto a reactivos de aislamiento celular óptimos ("CD4- CD56- CD19-, CD45RA+") con los otros grupos en los que se redujo el uso de anti-CD19 o anti CD45RA (Figuras 19A-D), se mostró que el porcentaje de destrucción independiente de TCR de la línea celular mutante H.My C1R HLA- A2 K66A en todos los grupos experimentales (calculado como un porcentaje del nivel obtenido en el grupo de control óptimo) fue muy similar (Figura 20) ($P > 0,05$ cuando se comparan los tres grupos de ensayo con el grupo de control de referencia).

10 Colectivamente, estos resultados sugieren que la reactividad de GVL mostrada por células aisladas con un uso mínimo de reactivos para el aislamiento de células T CD8, no es inferior a la asociada con protocolos de aislamiento más extensivos.

15 La destrucción de células tumorales de LLC-B autólogas por Tcm *in vivo* se realiza usando un modelo de Hu/SCID previamente empleado para la demostración de dicha destrucción por LLC-B mediante CTL antiterceros.

Ejemplo 4

20 *Generación de células Tcm humanas alogénicas antiterceros*

Inicio de un nuevo enfoque de uso en GMP para minimizar el riesgo de GVHD cuando se usan Tcm humanos alogénicos antiterceros

25 Como se ha demostrado previamente en un modelo de ratón, los Tcm antiterceros podrían ser muy útiles para la inducción de tolerancia en TMO alogénico [Ophir E. *et al.* Blood. (2010) 115(10): 2095-104]. En este caso, las células T CD8+ sin tratamiento previo que se originan del donante de MO alogénico actúan como células sensibles y se usan terceras células dendríticas (CD) donantes como estimulantes para permitir la generación de células Tcm no reactivas hospedadoras. Para evitar la GVHD, el tercer donante se selecciona para asegurar que ninguno de estos alelos del HLA de clase I se comparte con los alelos del HLA de clase I del hospedador.

30 No obstante, teniendo en cuenta que los pacientes humanos pueden ser más propensos a GVHD que ratones endogámicos, la traslación clínica de este enfoque debe buscarse con precaución. Podrían requerirse etapas de aloagotamiento adicionales, tales como fotoagotamiento o selección de células activadas al final del periodo de aloestimulación antiterceros, para reducir adicionalmente el riesgo de GVHD.

Modificaciones del protocolo humano autólogo (para protocolo alogénico)

40 Como se muestra en las Figuras 21-22, el protocolo para generar Tcm para el entorno alogénico difiere del protocolo para el entorno autólogo en dos etapas importantes:

45 a) Selección de células CD45RA+ después del aislamiento de células T CD8. Las células T de memoria tienen menor umbral de activación que células T sin tratamiento previo que pueden provocar expansión conducida por citocinas no específica de la fracción de células T de memoria. Estas células pueden incluir clones que reaccionan de forma cruzada con antígenos hospedadores, aumentando de este modo el riesgo de inducción de GVHD. Para minimizar el efecto provocado por la diferencia del porcentaje de células T sin tratamiento previo entre diferentes donantes humanos y para reducir el riesgo de GVHD, se usaron células T CD8 T sin tratamiento previo (CD45RA+CD8+) como la fuente para la generación de células Tcm.

50 b) Retirada de células T potencialmente reactivas al hospedador al final del cultivo, mediante agotamiento de células T CD8 activadas CD137+.

Extensión del periodo de privación de IL-7 e IL-15

55 Como se describe para los cultivos autólogos (anteriormente en el presente documento), los presentes inventores han observado que células T CD8 sin tratamiento previo expuestas a IL-7 e IL-15 proliferan de una manera independiente de antígeno. Por otro lado, las células T CD8 sin tratamiento previo expuestas a IL-21 en ausencia de estimulación alogénica no proliferaron, y ni siquiera sobrevivieron más allá del día 7 de cultivo. Por lo tanto, el retardo de la adición de IL-7 e IL-15 del día 3 al día 7 podría conducir potencialmente a un agotamiento selectivo de clones antihospedador no sensibles a las terceras células estimulantes.

60 Para definir el momento óptimo para la adición de citocina a la vez que el agotamiento de alorreactividad, se estimularon células T CD8 sin tratamiento previo con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia o ausencia de IL-21 durante 7 días. A continuación, las células no recibieron más activación y se expandieron con IL-7 e IL-15 (Figura 23B), IL-15 e IL-21 (Figura 23C) o IL-15 solamente (Figura 23D) hasta el día 65 13; las poblaciones celulares resultantes se compararon con las células T CD8 sin tratamiento previo cultivadas de

acuerdo con el grupo de control de referencia, se expandieron como se ha descrito para el entorno autólogo (incubación en d (0-3) con IL21 y CD; en d(3-13), adición de IL7+IL15 (Figura 23A).

5 Usando la misma secuencia de adición de citocinas que el grupo de control de referencia pero con diferente calendario, concretamente, la adición de IL-21 se extendió de 3 días a 7 días, y se añadieron IL-7 e IL-15 el día 7 y no el día 3, obstaculizó la expansión de las células (Figura 24A) (proliferación solamente hasta 54 ± 7 % de la mostrada por el grupo de control de referencia). Sin embargo, la inducción de fenotipo de memoria central fue similar (Figura 24B) ($99 \pm 14,8$ % de la mostrada por el grupo de control de referencia).

10 Como se muestra, la retirada de IL-7 y extensión de la adición de IL-21 al final del cultivo, redujo la expansión de las células (Figura 24A) (60 ± 13 % de la proliferación mostrada por el grupo de control de referencia), así como redujo la adquisición de fenotipo de memoria central ($82 \pm 6,8$ % del nivel de Tcm mostrado por el grupo de control de referencia, Figura 24B).

15 La sensibilización de células T CD8 sin tratamiento previo usando privación de citocinas de 7 días, seguido de la adición de solamente IL-15 desde el día 7 redujo drásticamente el potencial de expansión de las células (solamente $5 \pm 1,3$ % de proliferación de la mostrada por el grupo de control de referencia), y también redujo la adquisición del fenotipo de memoria central (Figura 24B) (68 ± 26 % del nivel de Tcm mostrado por el grupo de control de referencia).

20 El parámetro más crítico, es examina concretamente agotamiento de clones reactivos a hospedador (ensayos con donantes apropiados que son completamente distintos en HLA de clase I de las terceras células usadas para estimulación). También se llevan a cabo experimentos adicionales para optimizar el periodo de privación de citocinas.

25 *Un enfoque de clasificación magnética de dos estadios para agotamiento de alorreactividad, basándose en el marcador de activación CD137*

30 Un modo elegante de agotar clones antihospedador basándose en el concepto de terceros puede conseguirse mediante una técnica de clasificación magnética de dos estadios, que comprende las siguientes etapas de selección de CD 137:

- a. Selección positiva de clones específicos antiterceros al comienzo del cultivo.
- b. Agotamiento de clones específicos antihospedador cerca del final del cultivo.

35 Recientemente, se ha descrito que CD 137 es un marcador adecuado para activación específica de antígeno de células T CD8+ humanas, ya que CD137 no se expresa en células T CD8+ en reposo y su expresión se induce fiablemente después de 24 horas de estimulación.

40 Para evaluar este enfoque, se estimularon células T CD8 sin tratamiento previo con terceras CD alogénicas irradiadas en presencia de IL-21. Después de 14 horas de activación, se seleccionaron positivamente células CD137+ por clasificación magnética. Se volvieron a estimular células CD137+ con terceras CD alogénicas irradiadas en presencia de IL-21 hasta el día 3. A continuación, las células se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 10 y se activaron después con PBMC hospedadoras irradiadas en presencia de IL-7 e IL-15. Después de 24 horas de
45 activación, se agotaron las células CD137+ por clasificación magnética. Las células con agotamiento de CD137 se volvieron a sembrar con IL-7 e IL-15 y se cultivaron hasta el día 14. En días seleccionados, las células se evaluaron con respecto a números de células por exclusión de azul de tripano y el porcentaje de Tcm (CD62L+CD45RO+) dentro de la población de células CD8 T usando análisis de FACS. La frecuencia de células alorreactivas antiterceros y antihospedador se evaluó mediante ensayo de CFSE contra terceras PBMC o PBMC irradiadas del
50 hospedador. Estos resultados se compararon con los obtenidos en el grupo de control estimulado en presencia de IL-21 durante 3 días y a continuación expandido con IL-7 e IL-15 ("grupo de control de referencia").

Por lo tanto, como puede verse en la Figura 25, aunque inmediatamente después del enriquecimiento con respecto a células T CD8 sin tratamiento previo (día 0), solamente el 0,7 % de las células T CD8 totales expresaron CD137+,
55 tras activación contra terceras CD en presencia de IL-21 durante 14 h, el porcentaje de células T CD8 que expresaban CD137+ del compartimento de células T CD8 totales aumentó hasta el 8,3 % a diferencia del 2,5 % en ausencia de estimulación de CD. La clasificación magnética de esta subpoblación de células activadas condujo a un enriquecimiento notable de células CD137+ (85 %, respectivamente) y el nivel de células T CD8 CD62L+ en el compartimento de células T CD8 totales se redujo drásticamente del 84 % al 14 % (datos no mostrados).

60 Como se muestra en la Tabla 5, posteriormente, esta selección positiva se asoció con recuperación celular reducida. Por lo tanto, el día 0, el rendimiento de PBMC con agotamiento de células adherentes después de enriquecimiento con respecto a células T CD8 sin tratamiento previo fue del 7,6 % y el día 1, después de la selección positiva con respecto a CD137+, el rendimiento se redujo al 0,25 % (3,3 % de 7,6 %). Cuando se evaluó el día 7 del cultivo, el
65 grupo de ensayo de células T CD8 sometido a la selección positiva de células CD137+ se asemejó mucho al grupo de control de referencia en el porcentaje de células Tcm (67 % frente a 70 %, respectivamente) y esta similitud entre

los grupos en el porcentaje de Tcm también se mantuvo el día 10 de cultivo (54 % frente a 52 %, respectivamente) (Figura 26).

Tabla 5: Comparación de proliferación y número de células final

e	d	c	b	a	Grupo
(7,6) x (61) = 463 %		61		7,6 %	Control de referencia
(0,25) x (72) = 18 %	72		(3,3 % de 7,6 %) = 0,25 %		CD137+ anti terceros y CD137- anti hospedadoras

5 Las células T CD8 sin tratamiento previo se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 durante 3 días. Las células no recibieron más activación en lo sucesivo y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 14 ("grupo de control de referencia"). Como alternativa, las células T CD8 sin tratamiento previo se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 5,7:1 en presencia de IL-21. Después de 14 horas de activación, las células CD137+ se seleccionaron positivamente por clasificación magnética. Las células CD 137+ se volvieron a estimular después con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 hasta el día 3. A continuación, las células se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 10. El día 10, se activaron con PBMC hospedadoras irradiadas en presencia de IL-7 e IL-15 (a una relación de 1 a 2). Después de 24 h, las células CD 137+ se agotaron por clasificación magnética. Las células CD137 agotadas se volvieron a sembrar con IL-7 e IL-15 y se cultivaron hasta el día 14 ("CD137+ anti terceros y CD137- anti hospedadores"). Los días indicados, las células se contaron por exclusión de azul de tripano.

a = rendimiento después del enriquecimiento de células T CD8 sin tratamiento previo (representado como porcentaje del número de partida de células adheridas a PBMC).

b = rendimiento después de la activación con terceras CD y enriquecimiento de células T CD8 CD137+ (representado como porcentaje del número de partida de células adheridas a PBMC).

c = factor de expansión del día 0 al día 13.

d = factor de expansión del día 0 al día 14.

e = número de células final = (rendimiento) x (factor de expansión del día 0) (representado como porcentaje del número de partida de células adheridas a PBMC).

Además, cuando se evaluó la composición celular (% de células T CD8, % de células NK y % de células NKT) los días 7 y 10 de cultivo, el grupo de ensayo de células T CD8 sometido a selección positiva de células CD137+, se asemejaba mucho al grupo de control de referencia en su composición celular (Tabla 6, a continuación).

Tabla 6: El enriquecimiento de células T CD8 específicas antiterceros por selección positiva de células CD137+ no cambia drásticamente la composición celular

(NKT 16+) CD3+ CD16+	(NKT 56+) CD3+ CD56+	(NK16+) CD16+	CD3-	(NK56+) CD56+	CD3-	(Células T CD8) CD3+CD8+	Día 7
2,6	5,6	1,3		2		92,5	Grupo de control de referencia
5,2	7,8	3,8		3,2		88	CD137+ antiterceros
(NKT 16+) CD3+ CD16+	(NKT 56+) CD3+ CD56+	(NK16+) CD16+	CD3-	(NK56+) CD56+	CD3-	(Células T CD8) CD3+CD8+	Día 10
2,8	8,3	3,2		2,1		91,8	Grupo de control de referencia
3,6	6,3	4		4,1		87	CD137+ antiterceros

Las células T CD8 sin tratamiento previo se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 durante 3 días. A continuación, las células no recibieron más activación y se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 10 ("grupo de control de referencia"). Como alternativa, las células T CD8 sin tratamiento previo se estimularon con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 5,7:1 en presencia de IL-21. Después de 14 horas de activación, las células CD137+ se seleccionaron positivamente por clasificación magnética. Las células CD137+ se estimularon después con terceras CD alogénicas irradiadas a una relación de 4:1 en presencia de IL-21 hasta el día 3. A continuación las células se expandieron con IL-7 e IL-15 hasta el día 10. Las células se evaluaron con respecto a composición celular por análisis de FACS.

Por otro lado, como se muestra en la Figura 27, el grupo de ensayo de células T CD8 sometido a selección positiva de células CD137+ mostró potencial de expansión superior en comparación con el grupo de control de referencia en ambos puntos temporales (expansión de 35 frente a 7 veces del día 0 al día 7, respectivamente y expansión de 1119 frente a 34 veces del día 0 al día 10, respectivamente). El día 10, el grupo de células T CD8 sometido a selección positiva de células CD137+ se dividió en dos grupos de ensayo. En el primer grupo, las células continuaron expandiéndose con IL-7 e IL-15 hasta el día 14 ("CD137+ antiterceros"), mientras que las células en el segundo grupo de ensayo se activaron con PBMC hospedadoras irradiadas en presencia de IL-7 e IL-15. Después de 24 h de

activación las células CD137+ se agotaron por clasificación magnética. Las células CD137 agotadas se volvieron a sembrar con IL-7 e IL-15 y se cultivaron hasta el día 14 ("CD137+ antiterceros y CD137- antihospedador").

5 Cuando se evaluaron el día 13, las células T CD8 del grupo de ensayo sometidas a selección positiva de CD137+ continuaron mostrando potencial de expansión superior en comparación con el grupo de control de referencia en ambos puntos temporales (expansión de 134 frente a 61 veces, respectivamente). Por el contrario, las células T CD8 del grupo de ensayo sometidas tanto a selección positiva antiterceros de CD137+ como agotamiento de células CD137+ antihospedador, mostraron menor potencial de expansión cuando se evaluaron el día 14 (expansión de 72 veces) (Figura 27) lo que indica que la expansión celular entre los días 11 y 14 no pudo compensar la pérdida de células provocada por el agotamiento de células T CD137+ alorreactivas específicas antihospedador.

10 Como se muestra en la Figura 28, cuando se evaluó la expresión de CD137 el día 10, solamente el 0,5 % del compartimento de células T CD8 totales en las células T CD8 sometidas a selección positiva de células CD137+ expresó CD137+. Por lo tanto, las células T CD8 en este grupo regularon negativamente de forma considerable la expresión de CD137 (del 85 % el día 1 a solamente el 0,5 el día 10).

15 Sin embargo, después de 24 h de activación con PBMC hospedadoras irradiadas (a una relación 1 a 2, en favor de las PBMC hospedadoras), el porcentaje de células T CD8 que expresaban CD137+ del compartimento de células T CD8 totales aumentó hasta el 16 %. El agotamiento de estas células CD137+ por clasificación magnética redujo el porcentaje de células T CD8 que expresaban CD137 del compartimento de células T CD8 totales, del 16 % al 3 %.

20 Se realizó análisis final de alorreactividad antihospedador residual el día 14, comparando el nivel de células que conservaban CFSE tras estimulación contra PBMC hospedadoras a diferencia de terceras PBMC en presencia de IL-7.

25 Como se muestra en la Figura 29, el número de células que se divide específicamente después de estimulación con terceras PBMC fue aproximadamente 3 veces mayor en el grupo sometido a la selección positiva y negativa basada en CD 137 en comparación con el grupo de control de referencia (2259 frente a 741 células en división, respectivamente). Lo que es más importante, la retirada de células CD 137+ hacia el final del cultivo, evitó completamente la proliferación en respuesta a PBMC hospedadoras, a diferencia del grupo de control de referencia que mostraba proliferación detectable (134 células en división). Resulta interesante que el grupo que experimenta selección positiva de células activadas contra terceros sin retirada de clones antihospedador al final del cultivo, mostró mayor nivel de células reactivas al hospedador en comparación con el grupo de control, lo que indica reactividad cruzada potencial entre los alotipos del MHC del hospedador y terceras células estimulantes (aunque desapareadas deliberadamente por tipificación de HLA.) Por lo tanto, aunque la importancia de la etapa de agotamiento de antihospedador al final del cultivo está claramente indicada, se requieren más estudios para evaluar el papel potencial de la primera selección positiva de células activadas antiterceros.

35 Sin embargo, como se muestra en la Tabla 5, anterior, el agotamiento exitoso de clones específicos antihospedador por la clasificación magnética basada en CD 137 de dos estadios, permite en general menor recuperación de células al final del cultivo (18 % frente a 463 %, representado como porcentaje del número introducido de células adherentes a PBMC, respectivamente).

40 Colectivamente, este experimento preliminar indica que el agotamiento de alorreactividad por clasificación magnética de dos estadios, basado en el marcador de activación CD 137, es factible y podría incorporarse en el presente protocolo generando células Tcm alogénicas no reactivas al hospedador. Son atributos prometedores indicados: 1) altos niveles de expresión inducidos por la activación alogénica tras selección positiva se regularon negativamente completamente el día 10, lo que permitió otra aloactivación contra antígenos del hospedador. 2) La composición celular y el porcentaje de células Tcm no se vio afectado drásticamente por la clasificación magnética, basándose en el marcador de activación CD137. 3) La retirada de células CD137+ hacia el final del cultivo, evitó completamente la proliferación en respuesta a PBMC hospedadoras, a diferencia del grupo de control de referencia, que mostró proliferación detectable (134 células en división). Los estudios actuales incluyen: 1) el uso de bloqueo de FcR antes de la etapa de selección positiva. 2) Uso de CD hospedadoras en lugar de PBMC para detección más eficaz de células reactivas al hospedador al final del cultivo. 3) Adición de marcadores de activación más clínicamente disponibles como CD25 o captura de IFN gamma a la etapa de agotamiento.

55 Conclusiones

El uso de agotamiento de CD 137 al final de la generación de Tcm podría proveer un enfoque factible para agotar adicionalmente la alorreactividad de estas células.

60 Se exploran intentos de continuar refinando el uso de agotamiento de CD 137 junto con agotamiento de CD25, ambos de los cuales están disponibles como reactivos de GMP.

65 Además, se llevan a cabo experimentos para minimizar la reactividad cruzada potencial usando APC artificiales que portan solamente un alelo del HLA-I.

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una población aislada de células que comprende células antiterceros que no inducen injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo dichas células, células inductoras de tolerancia y/o dotadas con actividad antienfermedad, y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después del trasplante, comprendiendo el método:
- (a) tratar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un agente capaz de agotar células CD4+ y/o CD56+ para obtener células T CD8+;
 - (b) poner en contacto dichas células CD8+ con un tercer antígeno o terceros antígenos en presencia de IL-21 durante 12 horas hasta 5 días para permitir el enriquecimiento de células reactivas a antígeno; y
 - (c) cultivar dichas células resultantes de la etapa (b) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos durante 5-20 días para permitir la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), generando de este modo la población aislada de células.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- agotar células adherentes de dichas PBMC antes de la etapa (a);
 - o
 - seleccionar células CD45RA+ y/o CD45RO- después de la etapa (a) y antes de la etapa (b);
 - o
 - cultivar dichas células resultantes de la etapa (a) con un tercer antígeno o terceros antígenos en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 después de la etapa (a) y antes de la etapa (b); o
 - seleccionar células activadas después de la etapa (a) y antes de la etapa (b);
 - o
 - agotar células alorreactivas después de la etapa (b).
3. Un método para generar una población aislada de células, que comprende células antiterceros que no inducen injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo dichas células, células inductoras de tolerancia y/o dotadas con actividad de injerto contra leucemia (GVHD), y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después del trasplante, comprendiendo el método:
- (a) tratar células mononucleares de sangre periférica no adherentes (PBMC) con un agente capaz de agotar células CD4+ y/o CD56+ para obtener células T CD8+;
 - (b) poner en contacto dichas células T CD8+ con terceras células dendríticas en presencia de IL-21 durante 12 horas hasta 5 días para permitir el enriquecimiento de células reactivas a antígeno;
 - (c) cultivar dichas células resultantes de la etapa (b) con dichas terceras células dendríticas en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 durante 12 horas a 3 días; y
 - (d) cultivar dichas células resultantes de la etapa (c) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos durante 5-20 días para permitir la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), generando de este modo la población aislada de células.
4. Un método para generar una población aislada de células que comprende células antiterceros que no inducen injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), estando dichas células dotadas de actividad antienfermedad, y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de trasplante, comprendiendo el método:
- (a) tratar células mononucleares de sangre periférica no adherentes (PBMC) con un agente capaz de agotar células CD4+ y/o CD56+ para obtener células T CD8+;
 - (b) poner en contacto dichas células T CD8+ con células dendríticas no singénicas en presencia de IL-21 durante 12 horas hasta 5 días para permitir el enriquecimiento de células reactivas a antígeno;
 - (c) cultivar dichas células resultantes de la etapa (b) con dichas células dendríticas no singénicas en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 durante 12 horas a 3 días; y
 - (d) cultivar dichas células resultantes de la etapa (c) en presencia de IL-21, IL-15 e IL-7 en un ambiente sin antígenos durante 5-20 días para permitir la proliferación de células que comprenden dicho fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), generando de este modo la población aislada de células.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, que comprende además:
- seleccionar células CD45RA+ y/o CD45RO- después de la etapa (a) y antes de la etapa (b);
 - o
 - seleccionar células activadas después de la etapa (b) y antes de la etapa (c);
 - o
 - agotar células alorreactivas después de la etapa (d).

6. El método de la reivindicación 1, 3 o 4, en el que dichas células antiterceros que tienen un fenotipo de memoria central T comprenden una identificación CD3+, CD8+, CD62L+, CD45RA-, CD45RO+, y en el que al menos el 50 % de la población aislada de células son células CD3+CD8+ de las que al menos el 50 % tienen dicha identificación.
- 5 7. Una población aislada de células que comprende células antiterceros no inductoras de injerto contra hospedador (GVHD) que tienen un fenotipo de linfocito T de memoria central (Tcm), siendo dichas células células inductoras de tolerancia y/o dotadas con actividad antienfermedad y capaces de dirigirse a los ganglios linfáticos después de trasplante, en la que dichas células antiterceros que tienen un fenotipo de memoria central T comprenden una
10 identificación CD3+, CD8+, CD62L+, CD45RA-, CD45RO+; y en la que al menos el 50 % de la población aislada de células son células CD3+CD8+ de las que al menos el 50 % tienen dicha identificación, generada de acuerdo con el método de las reivindicaciones 1-6.
8. Una composición terapéuticamente eficaz que comprende la población aislada de células de la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto que lo necesite, en la que la enfermedad se
15 selecciona del grupo que consiste en una enfermedad maligna, una enfermedad vírica y una enfermedad autoinmunitaria.
9. Una composición terapéuticamente eficaz que comprende la población aislada de células de la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de un sujeto que necesite un trasplante celular o tisular o para tratar a un sujeto que
20 necesite un trasplante de células hematopoyéticas inmaduras.
10. La composición terapéuticamente eficaz que comprende la población aislada de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho trasplante celular o tisular se selecciona del grupo que consiste en un hígado, un páncreas, un bazo, un riñón, un corazón, un pulmón, una piel, un intestino y un tejido u órgano
25 linfoide/hematopoyético; o en la que dicho trasplante celular o tisular comprende células hematopoyéticas inmaduras.
11. La composición terapéuticamente eficaz que comprende la población aislada de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho trasplante celular o tisular comprende un cotrasplante de varios órganos;
30 y opcionalmente en la que dicho cotrasplante comprende el trasplante de células hematopoyéticas inmaduras y un órgano sólido;
y opcionalmente en la que dichas células hematopoyéticas inmaduras y dicho órgano sólido se obtienen del mismo donante;
35 y opcionalmente en la que dicho trasplante celular o tisular y dicha población aislada de células proceden del mismo donante;
y opcionalmente en la que dicho trasplante celular o tisular es singénico con el sujeto y dicha población aislada de células no es singénica con el sujeto;
y opcionalmente en la que dicho trasplante celular o tisular es singénico con el sujeto y dicha población aislada de células es singénica con el sujeto.
40
12. La composición terapéuticamente eficaz que comprende la población aislada de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dichas células hematopoyéticas inmaduras y dicha población aislada de células proceden del mismo donante;
45 y opcionalmente en la que dicho donante no es singénico con el sujeto;
y opcionalmente en la que dichas células hematopoyéticas inmaduras y dicha población aislada de células proceden del sujeto.

FIG. 1A

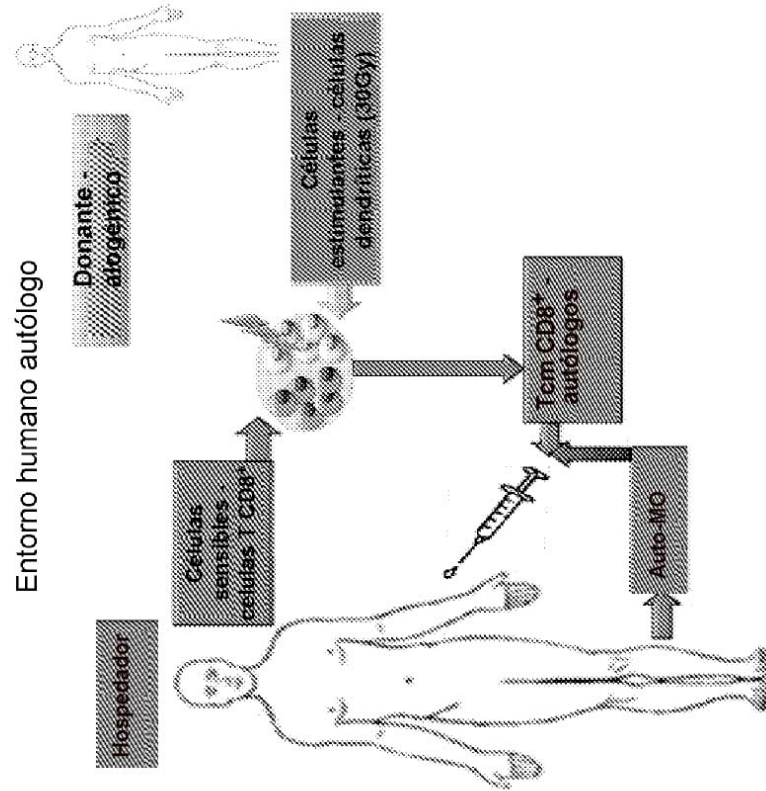


FIG. 1B

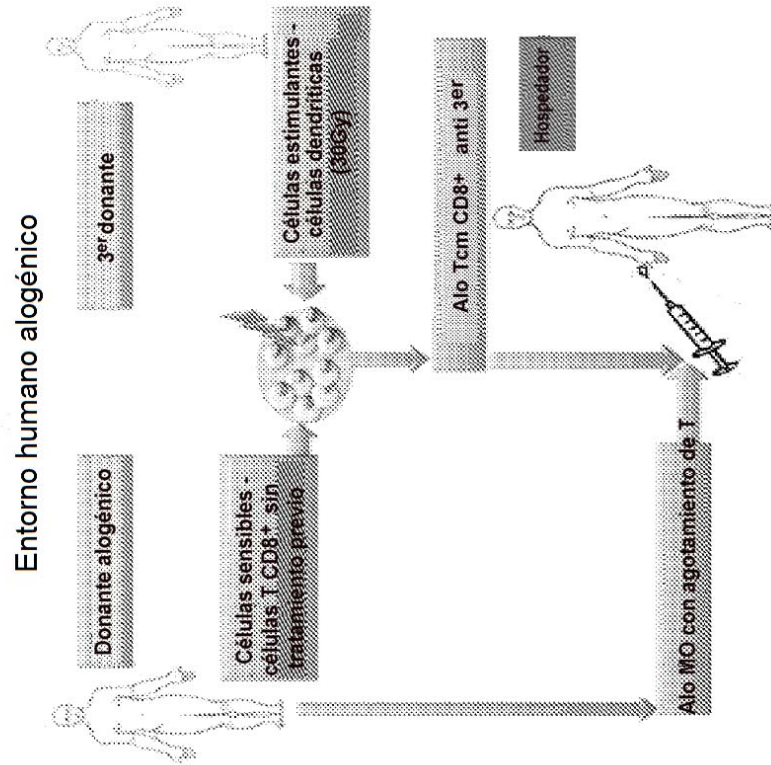


FIG. 2A

Entorno de ratón singénico

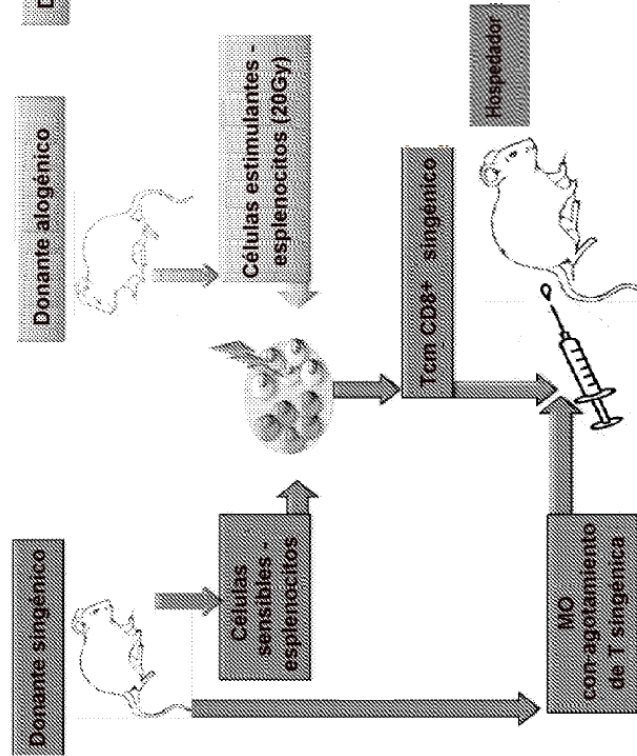


FIG. 2B

Entorno de ratón allogénico

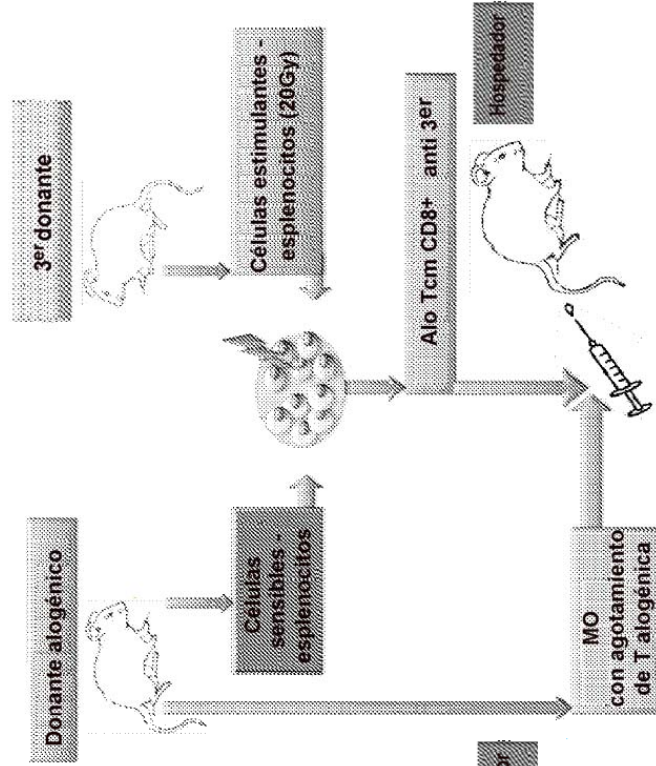


FIG. 3A

Protocolo humano autólogo para generación de Tcm

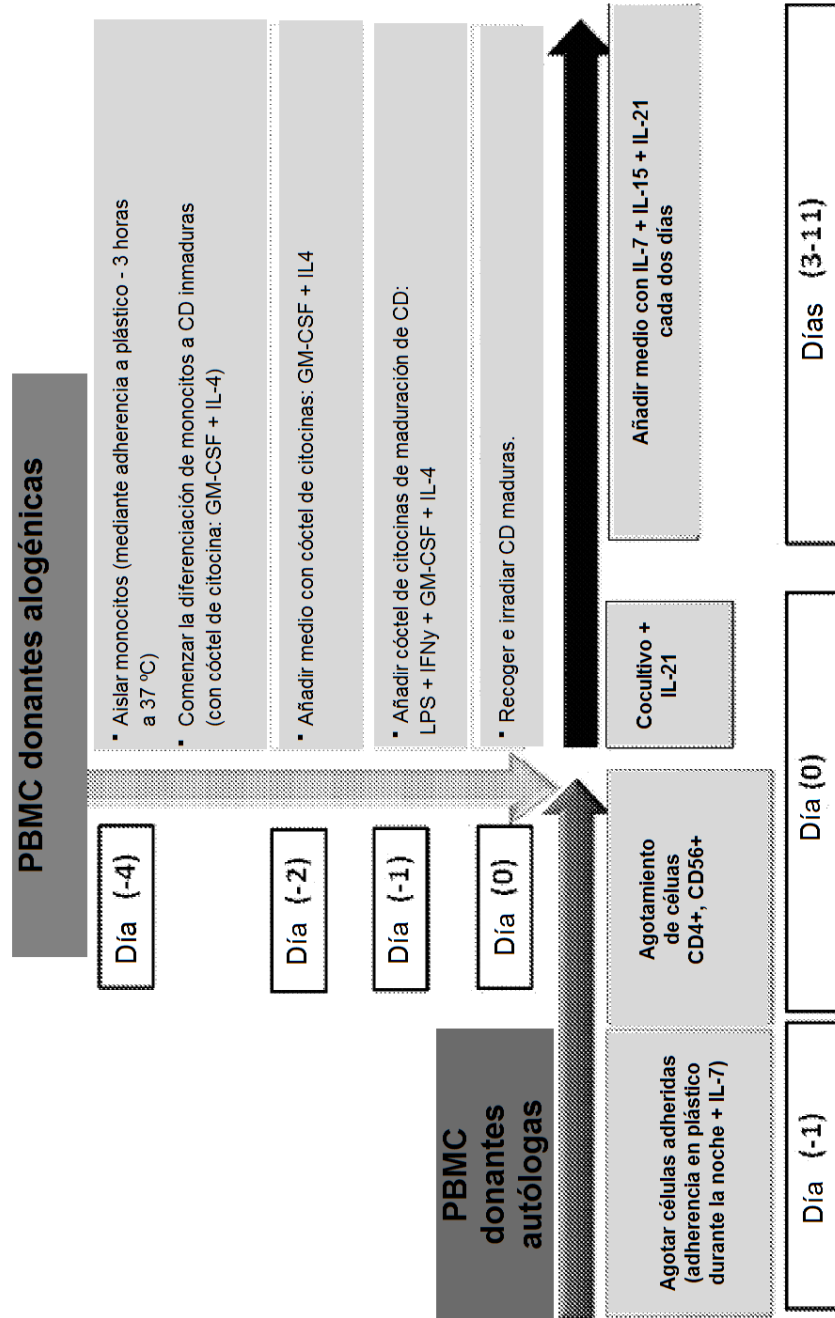
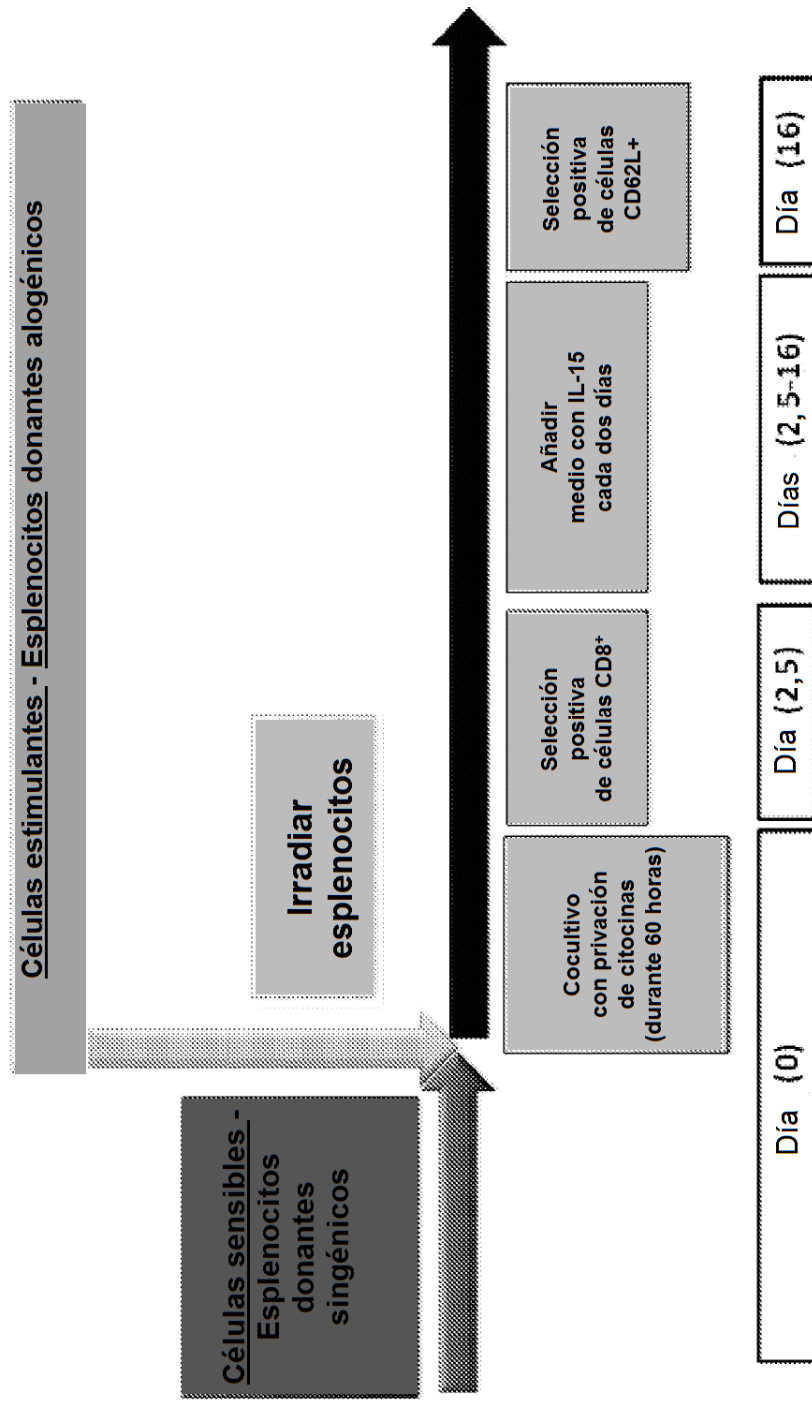


FIG. 3B

Protocolo de ratón singénico para generación de Tcm



Día de cultivo		0	7,5	10,5	12,5
FIG. 4A	PROMEDIO	94,1	94,3	93,0	94,8
	ET	0,5	1,1	1,6	1,2
	n	8	5	4	2
CD8+CD3+	PROMEDIO	0,2	1,1	1,4	1,2
	ET	0,0	0,6	0,5	*
	n	2	6	3	1
CD56+ CD3-	PROMEDIO	*	3,4	4,7	2,6
	ET	*	1,5	3,6	*
	n	*	3,0	2,0	1,0

FIG. 4B

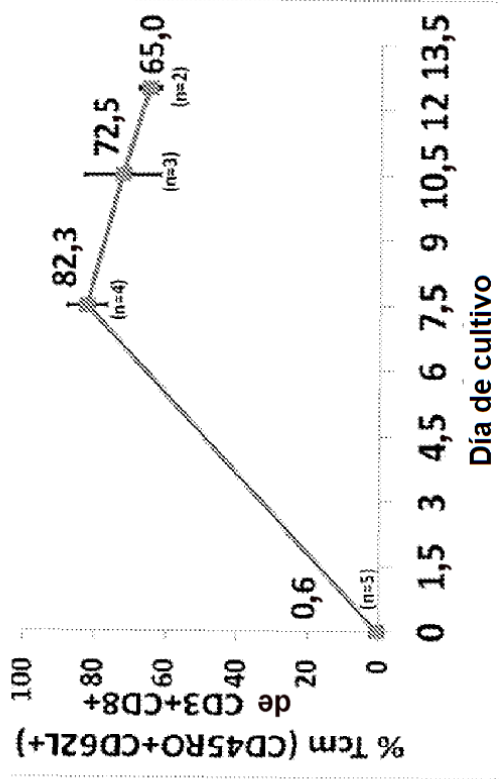


FIG. 4C

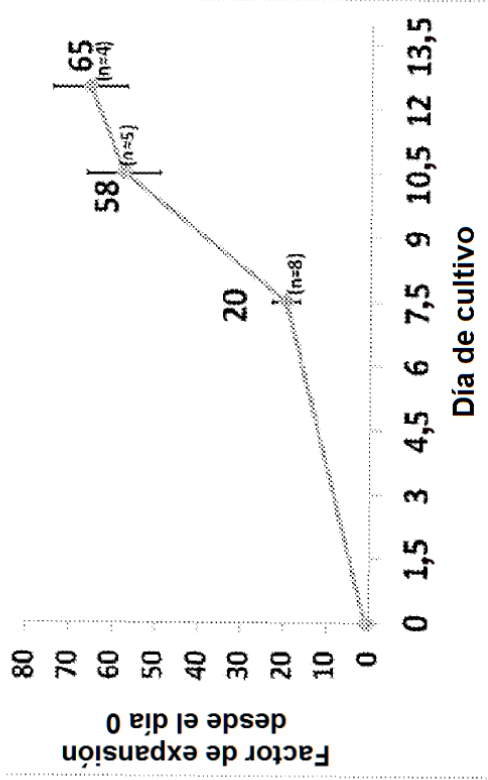


FIG. 5A

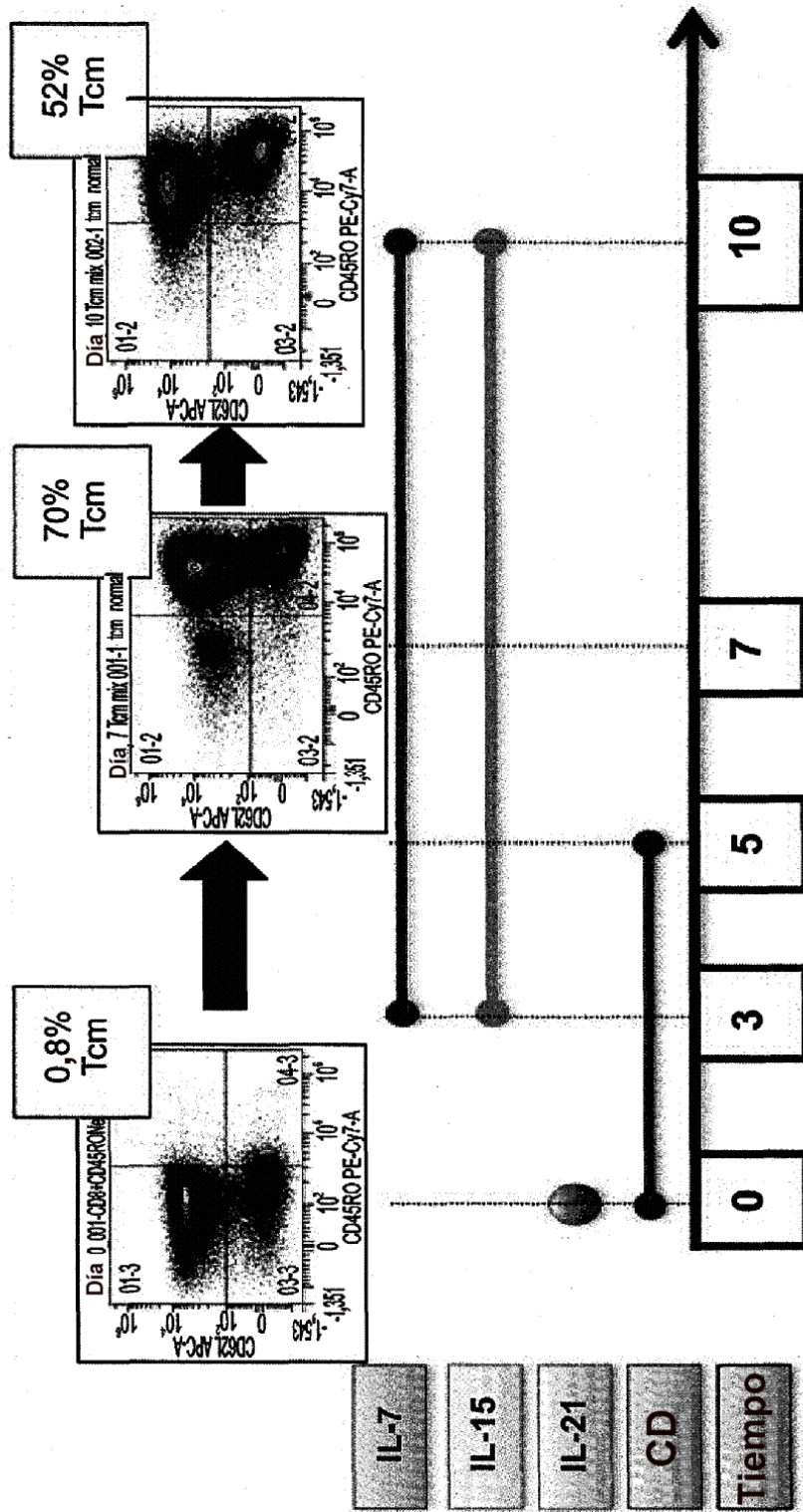


FIG. 5B

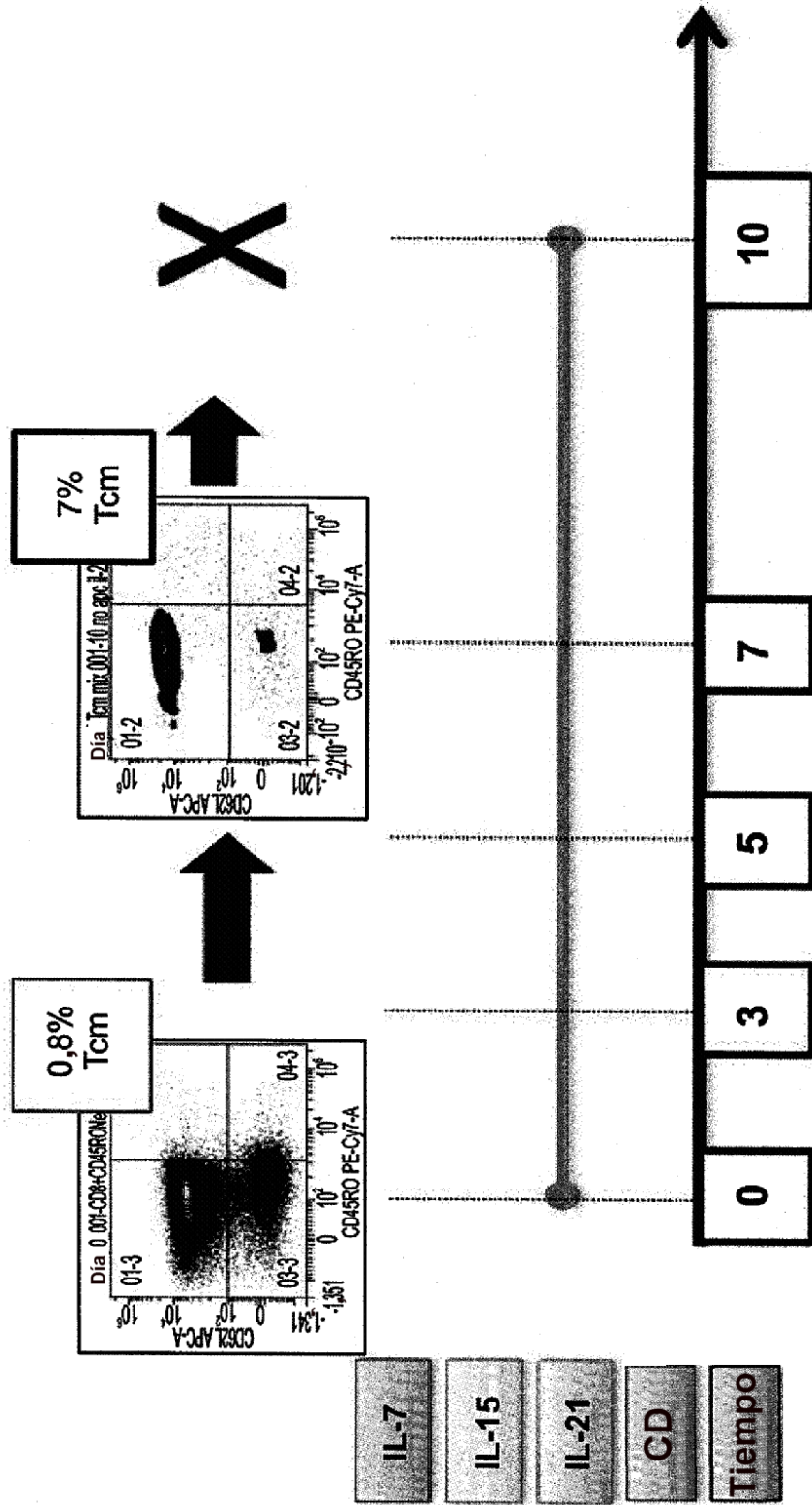
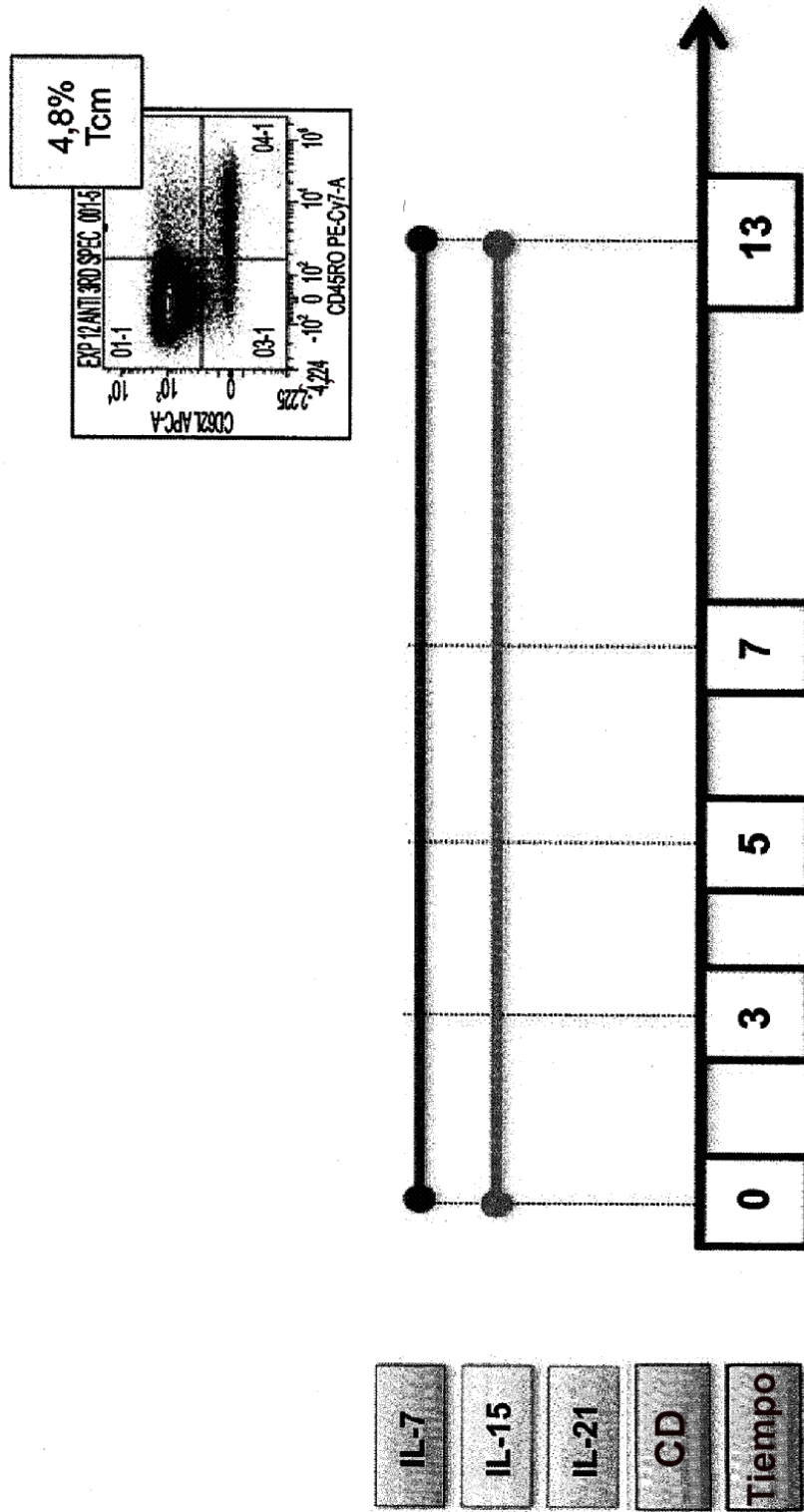


FIG. 5C



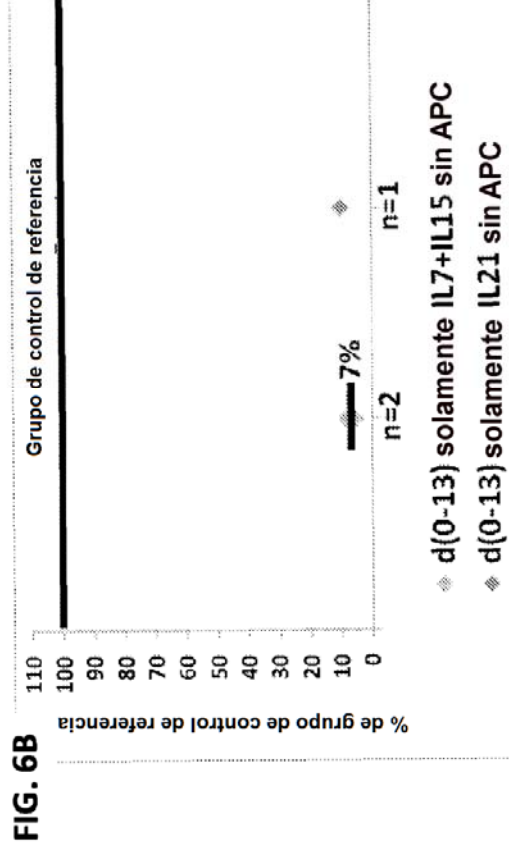
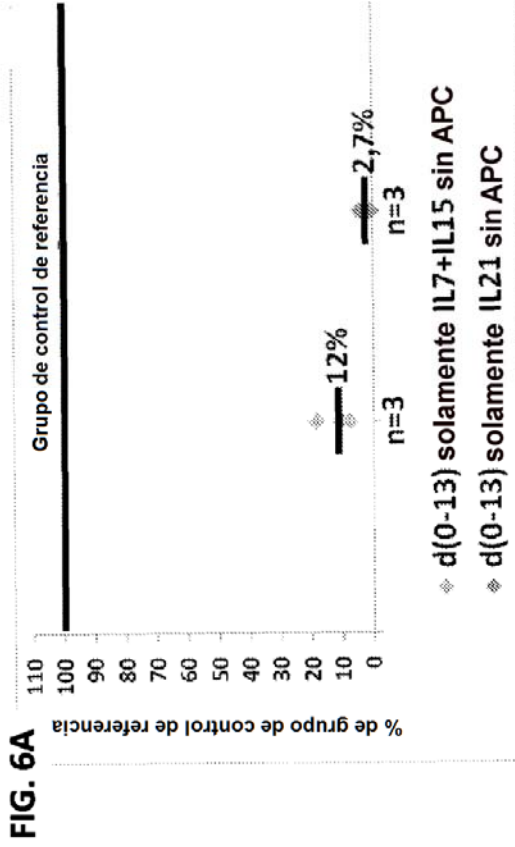


FIG. 7A

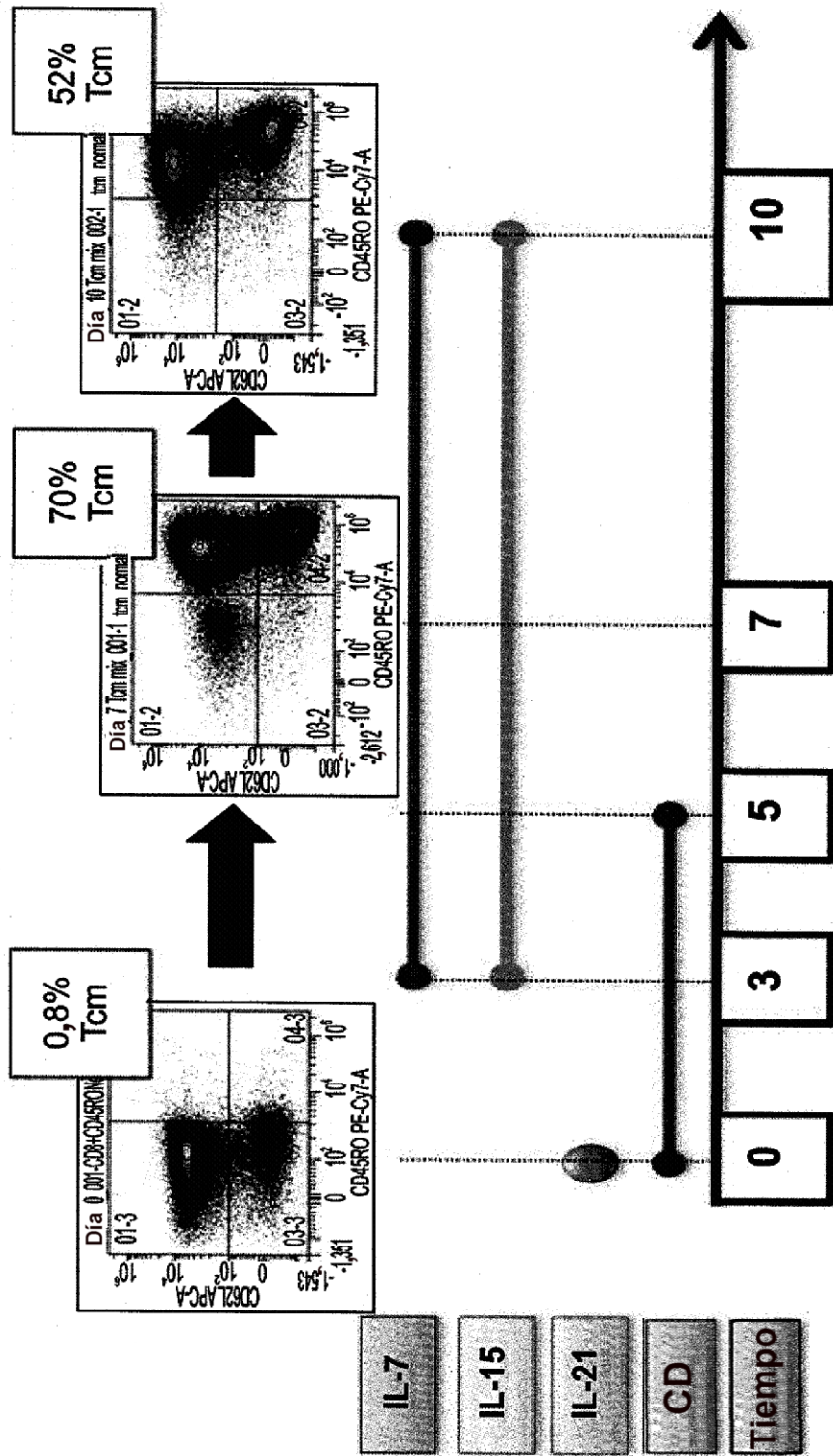


FIG. 7B

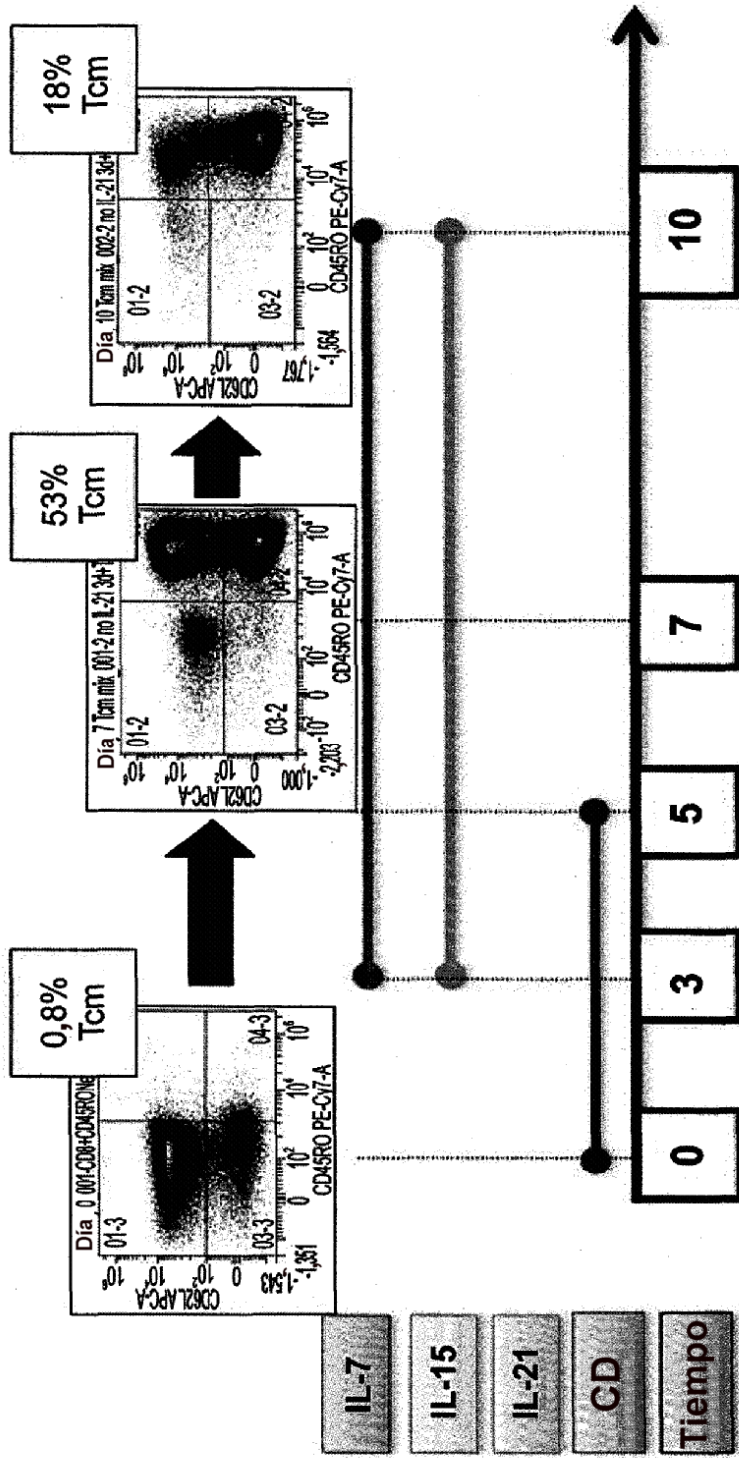
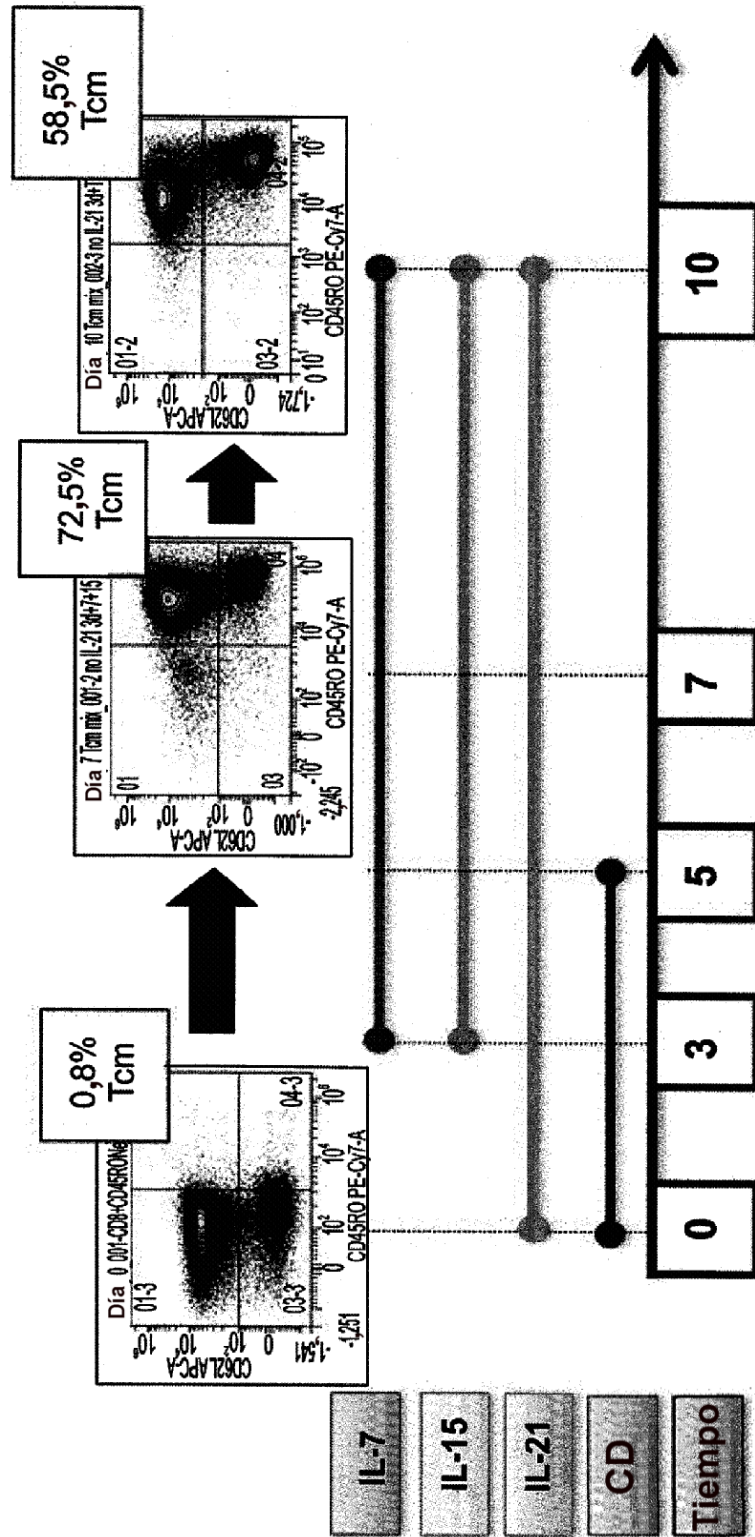


FIG. 7C



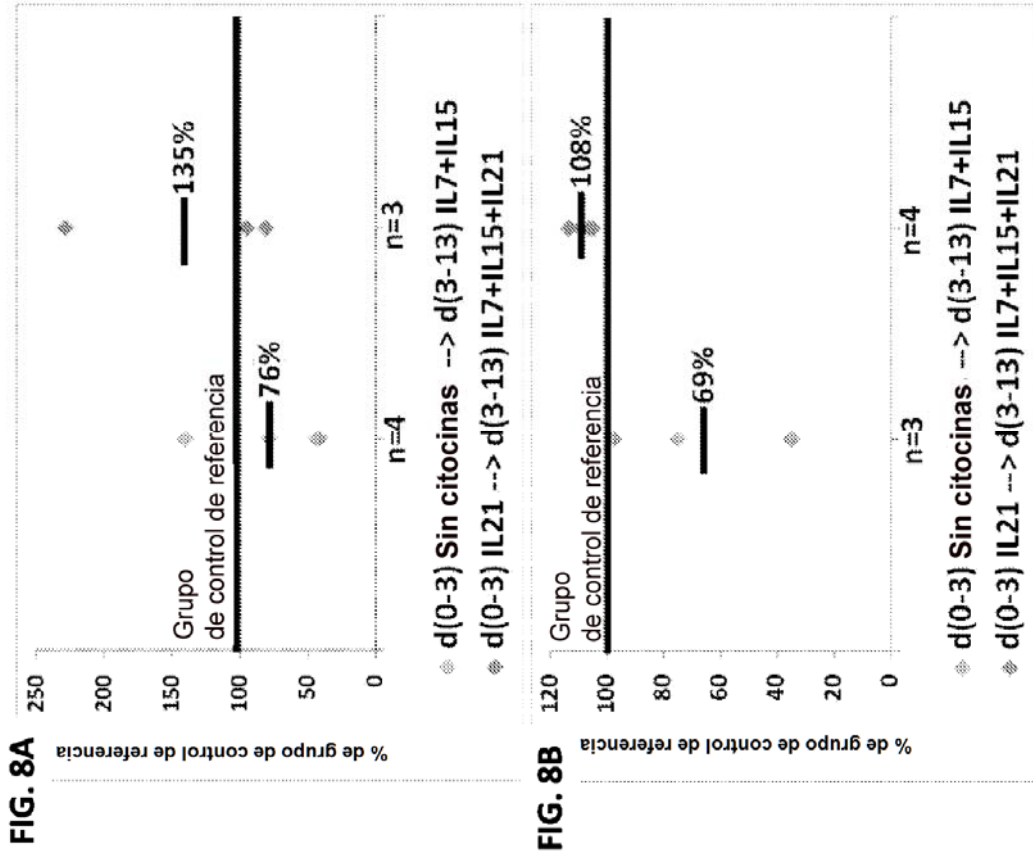


FIG. 9A

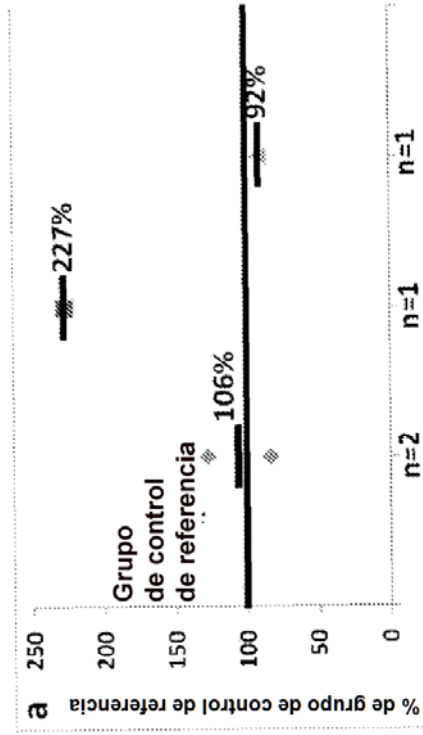
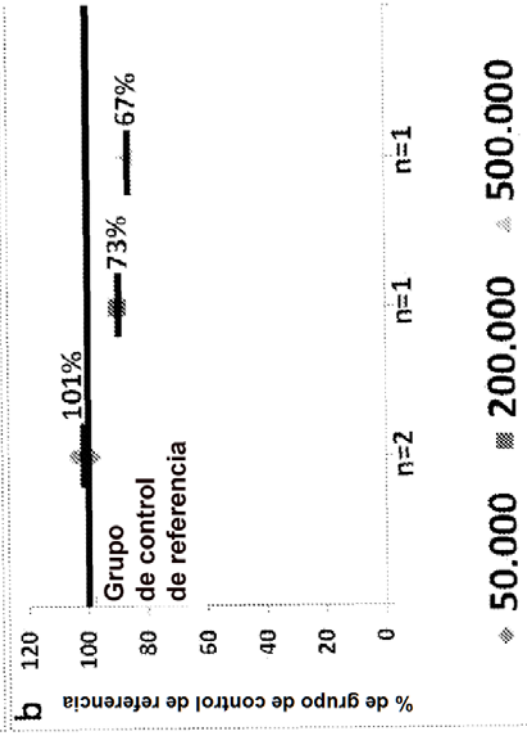
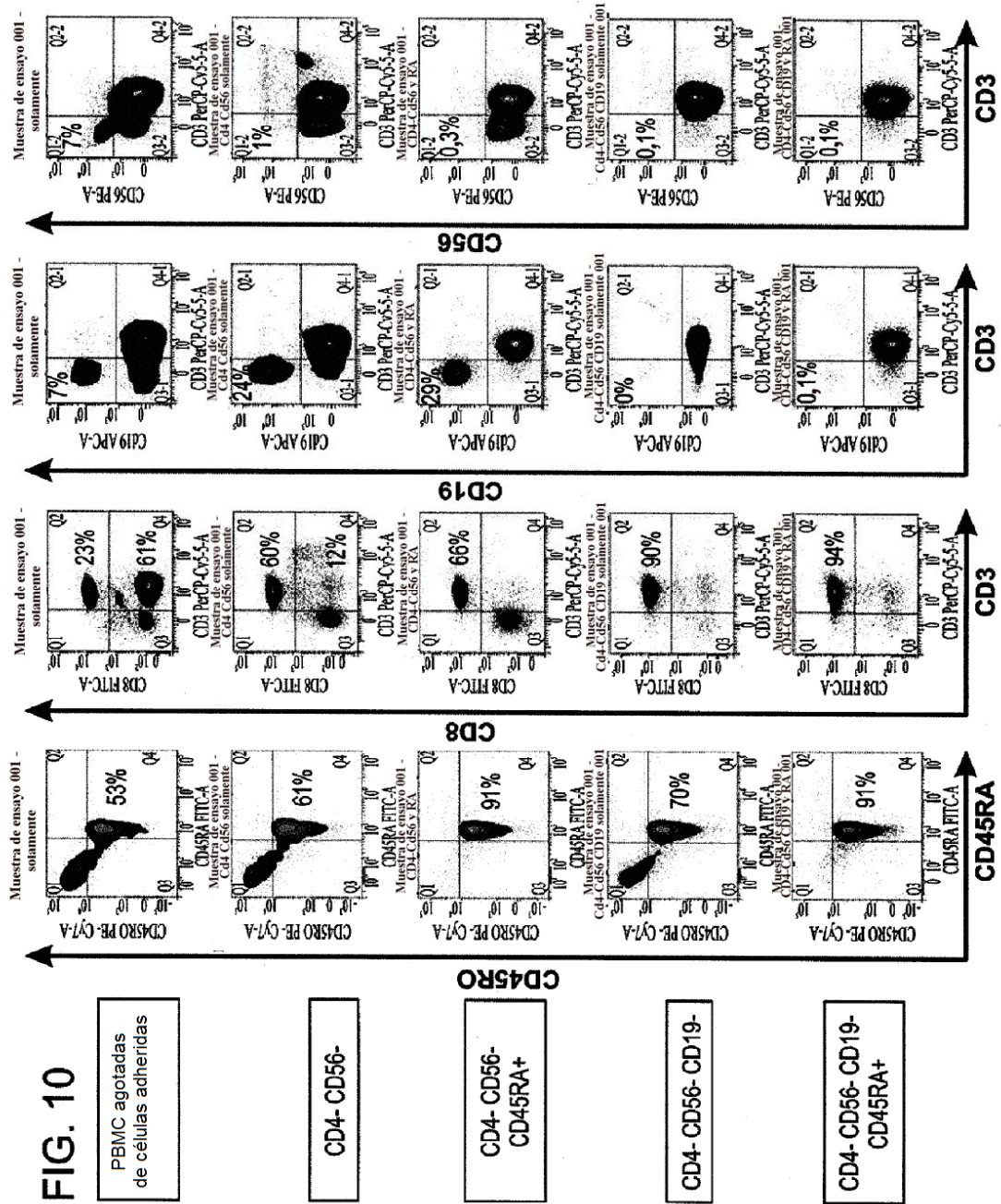


FIG. 9B





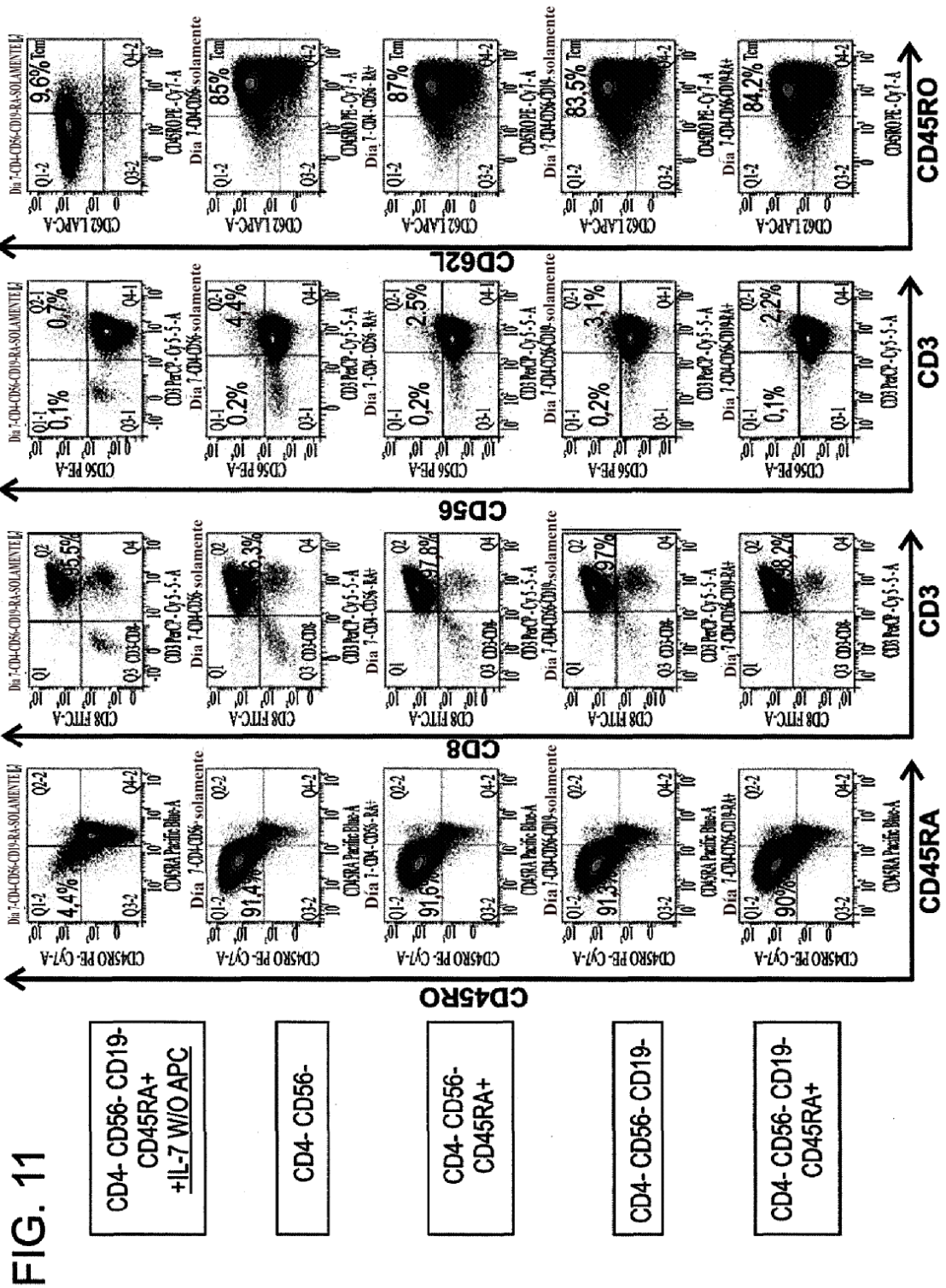


FIG. 13A

%CD3+CD8+NKT- (día 7)

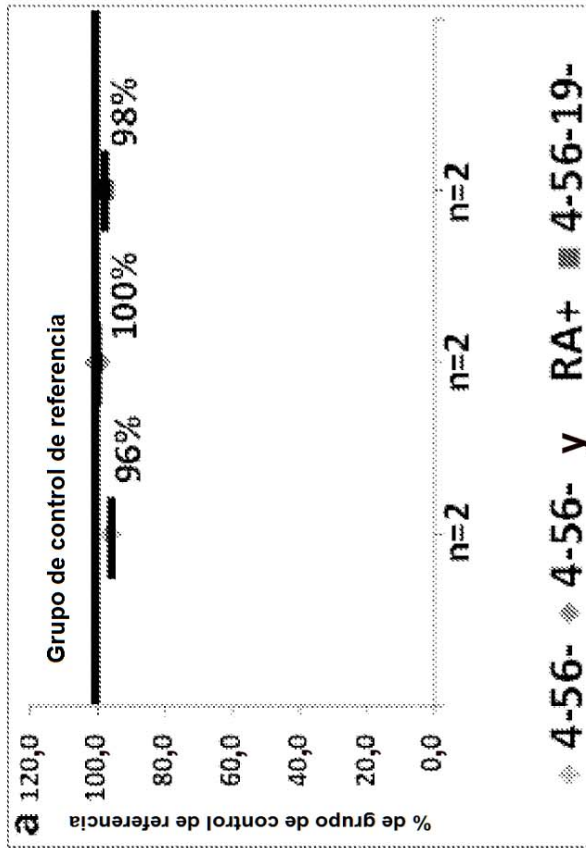
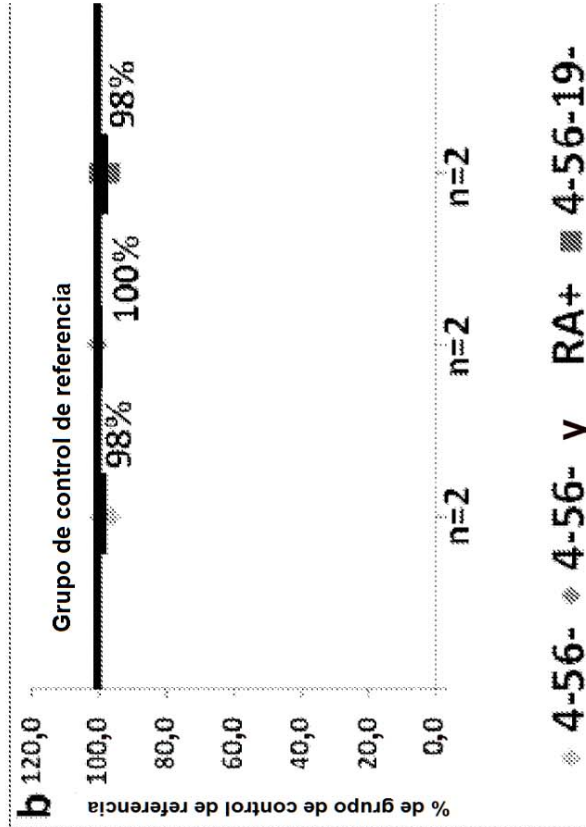
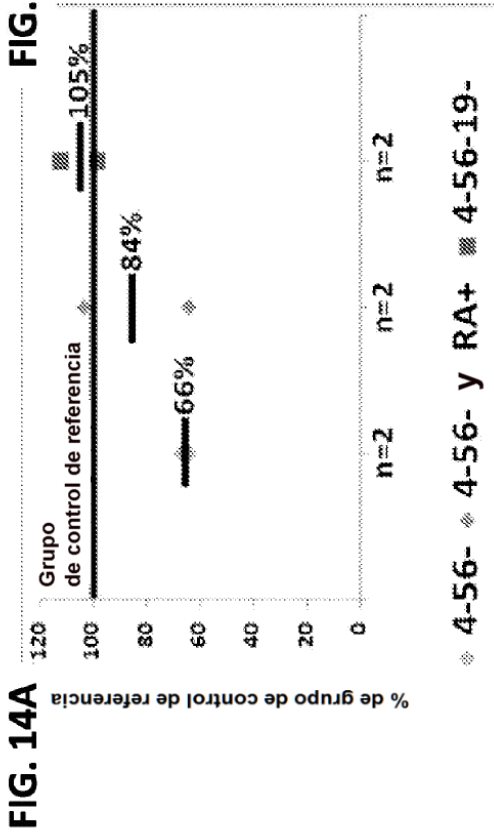


FIG. 13B

%Tcm (día 7)



Factor de expansión desde el día 0 (día 10)



Rendimiento después de la clasificación magnética

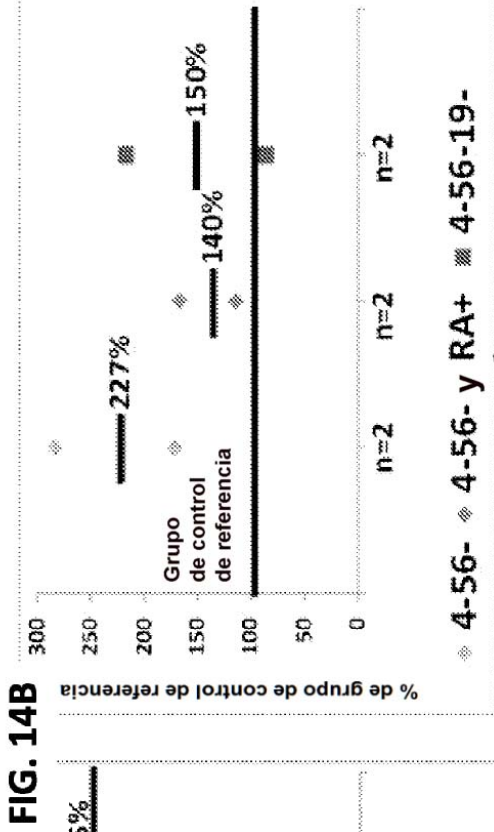


FIG. 14C

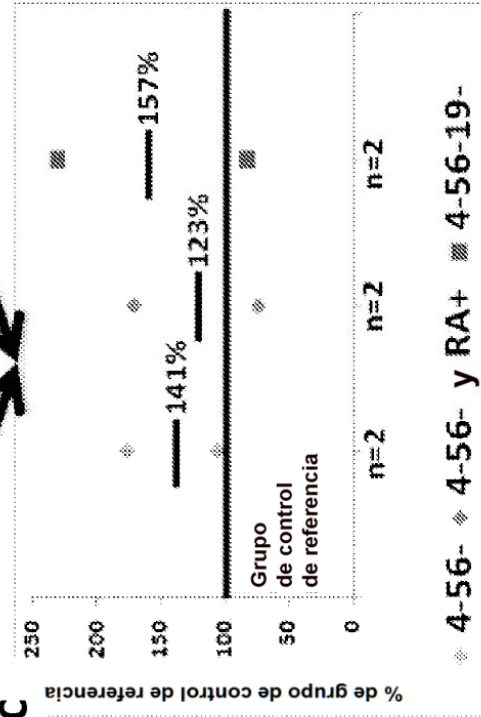
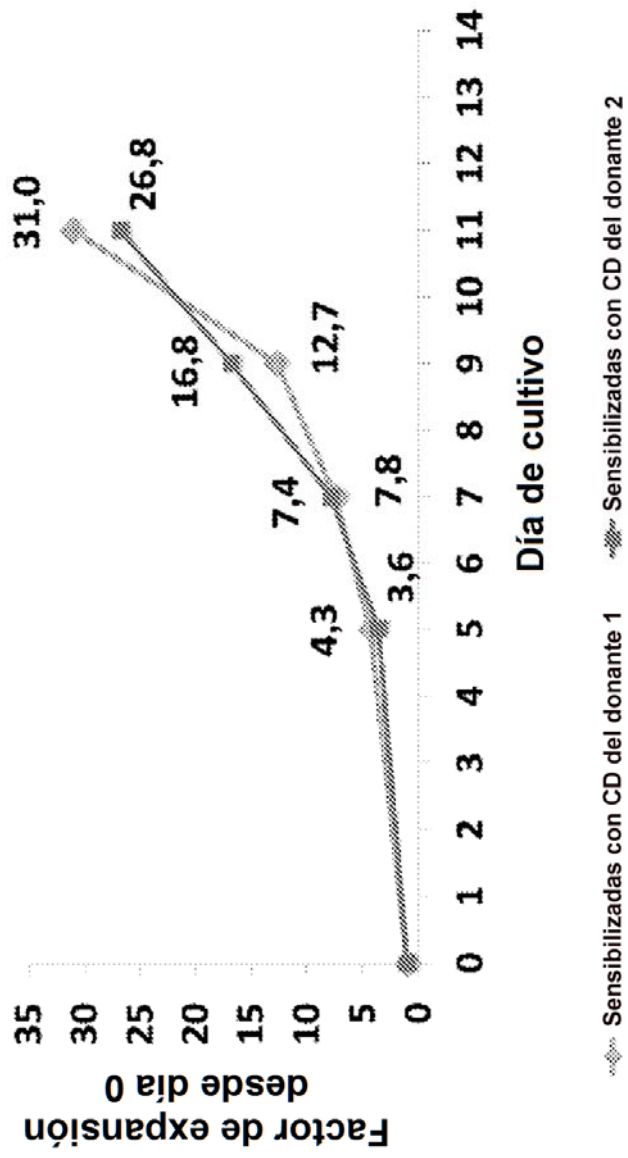
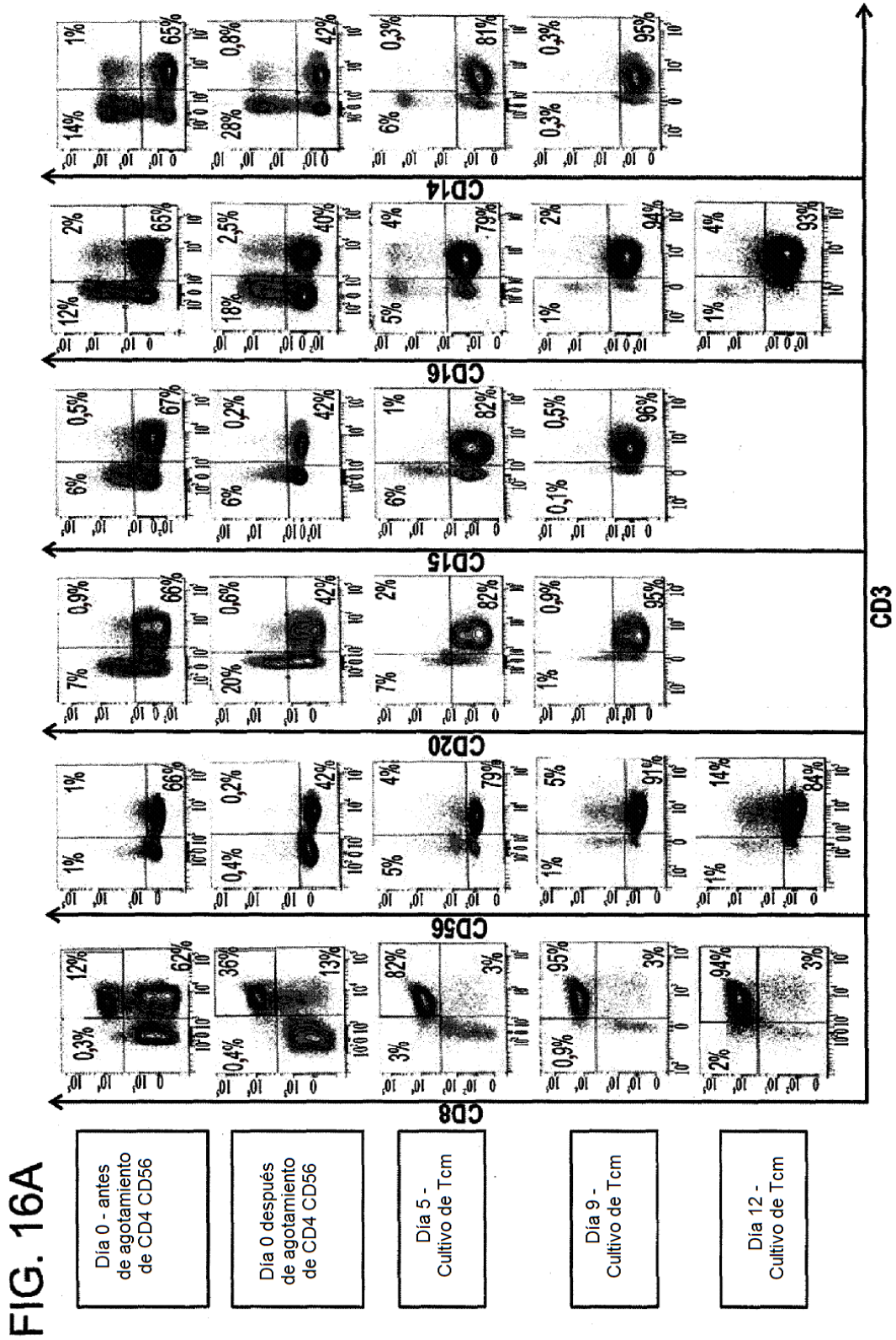


FIG. 15





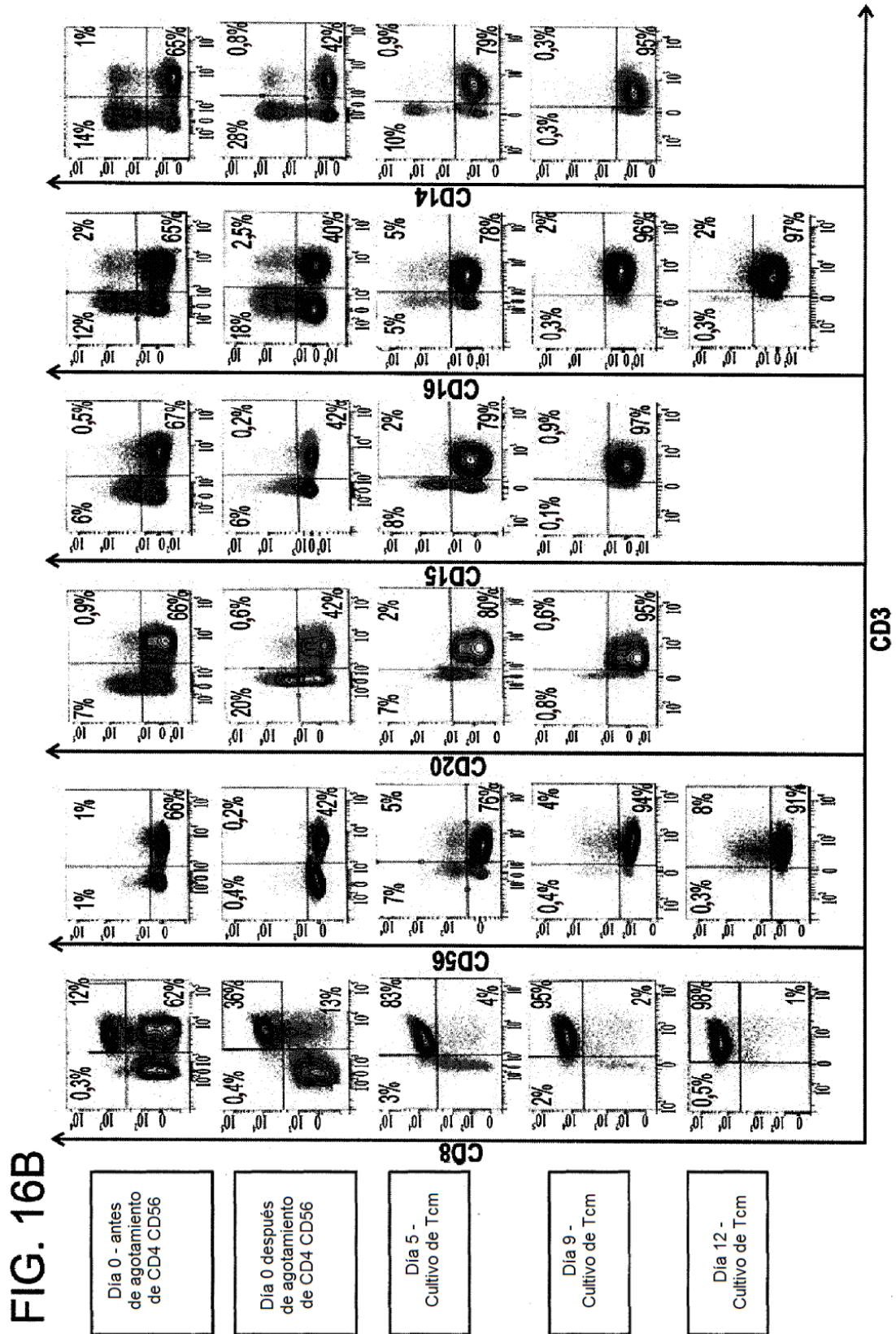


FIG. 17A

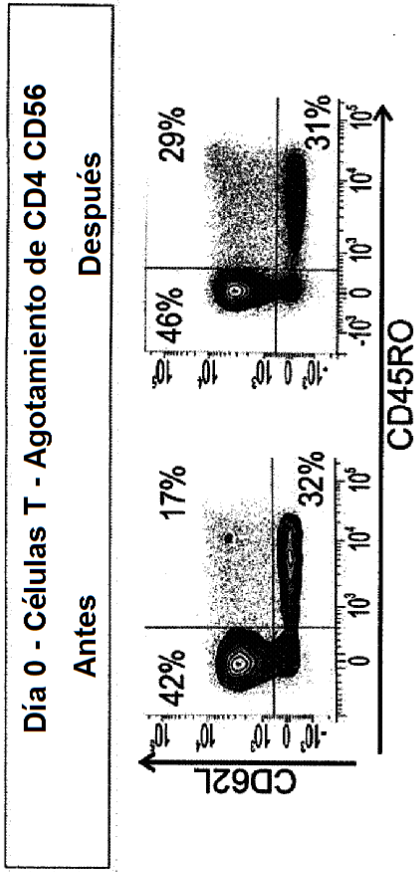


FIG. 17B

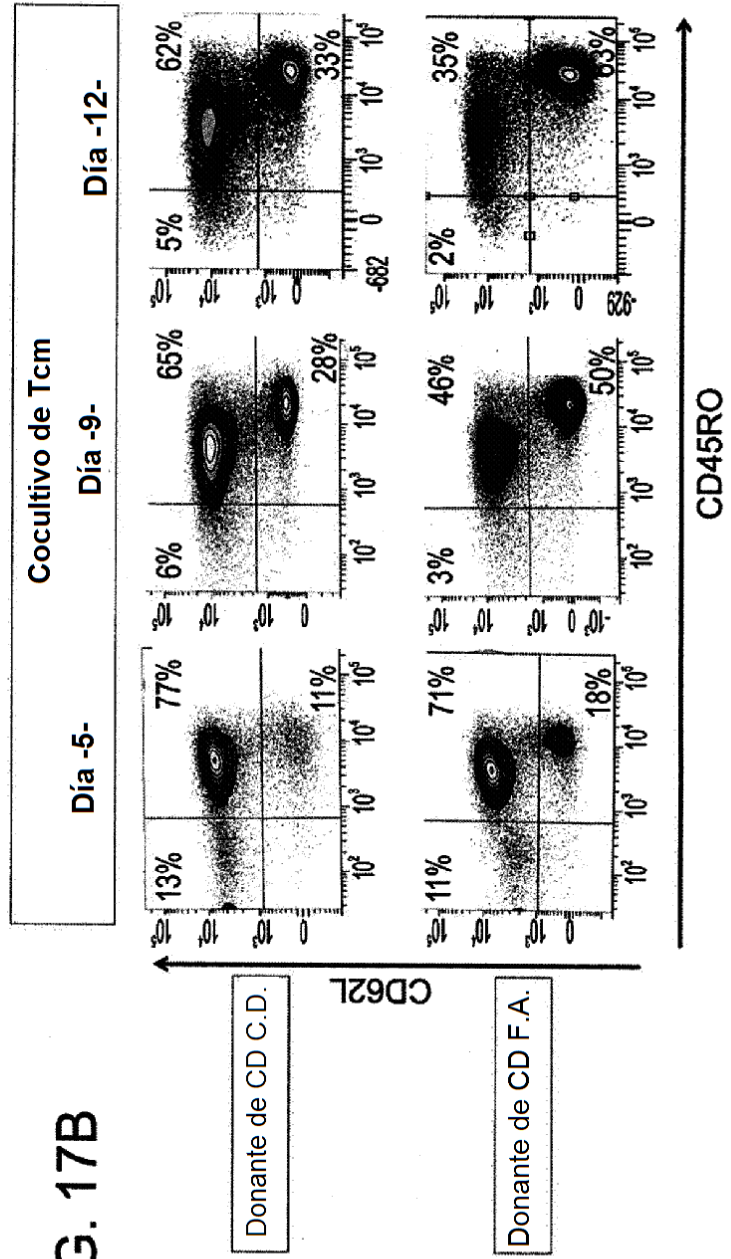


FIG. 17C

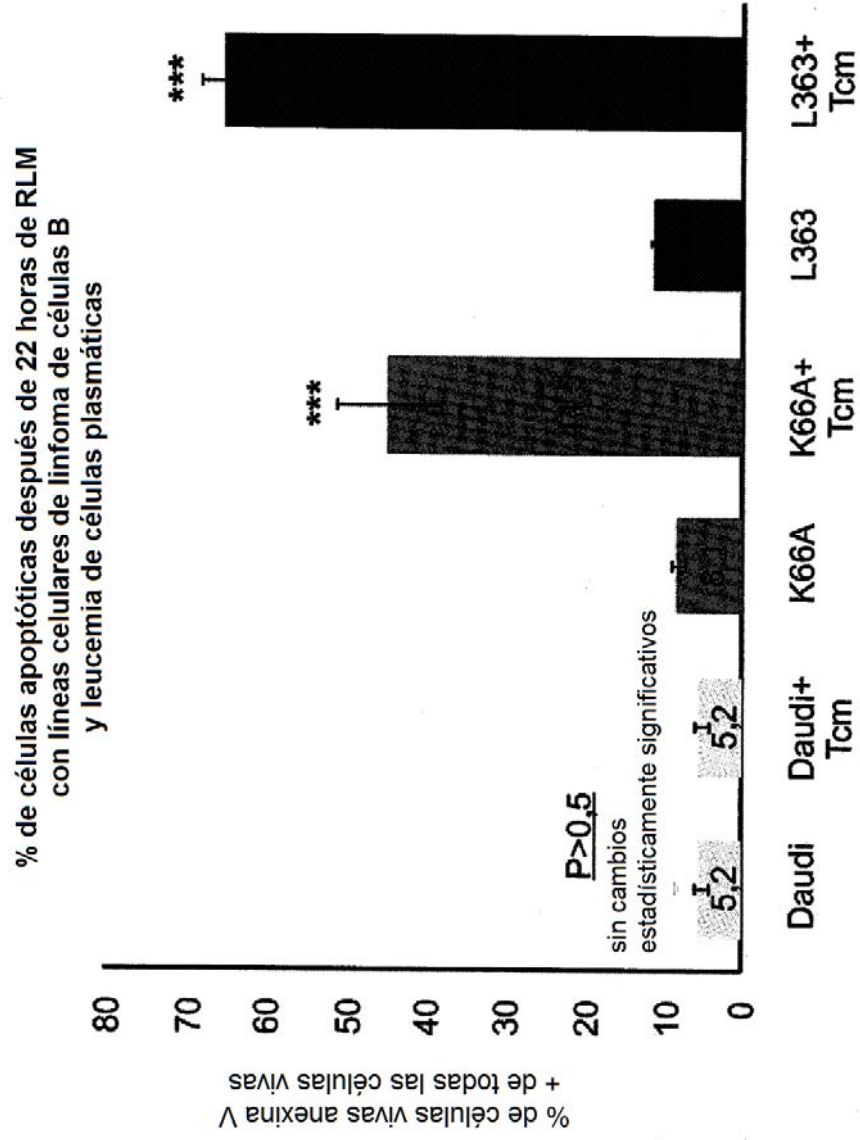


FIG. 18

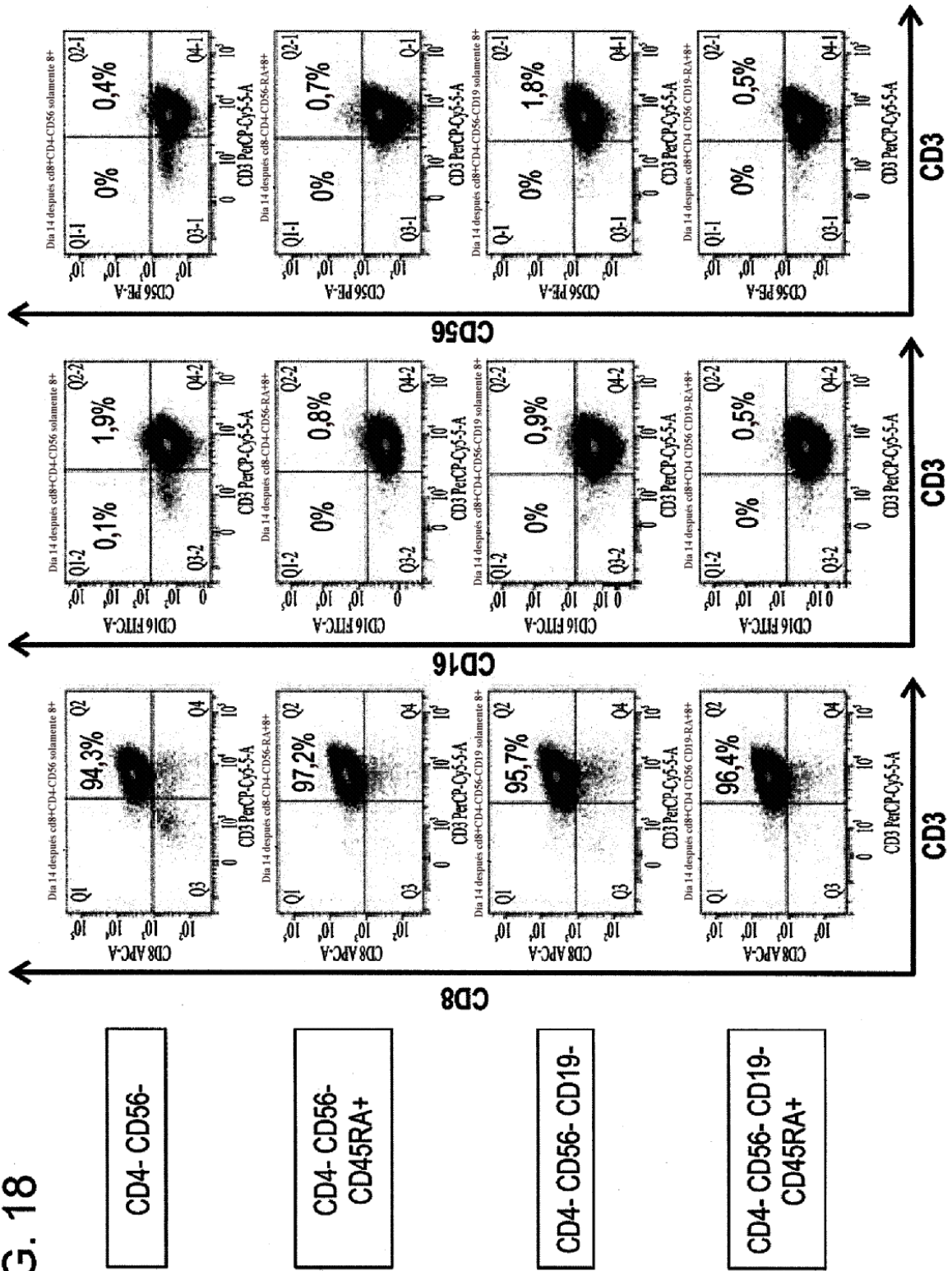


FIG. 19C

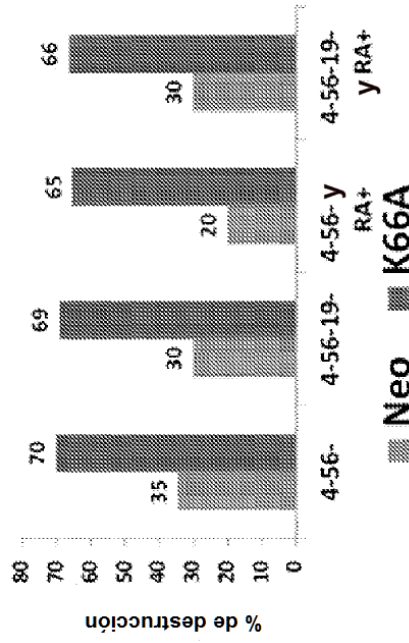


FIG. 19A

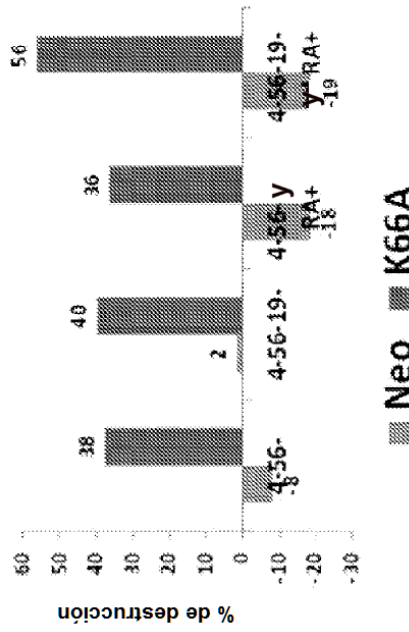


FIG. 19D

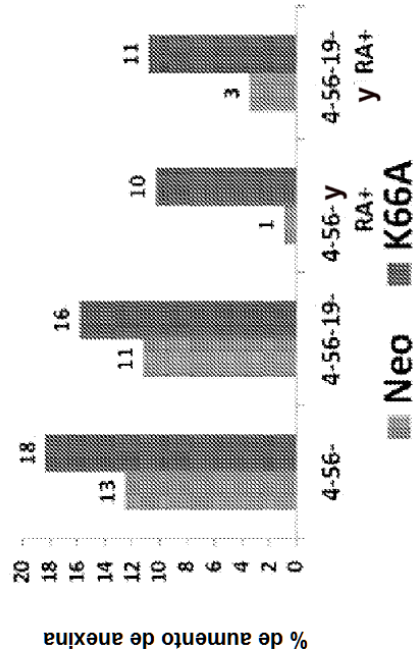


FIG. 19B



FIG. 20

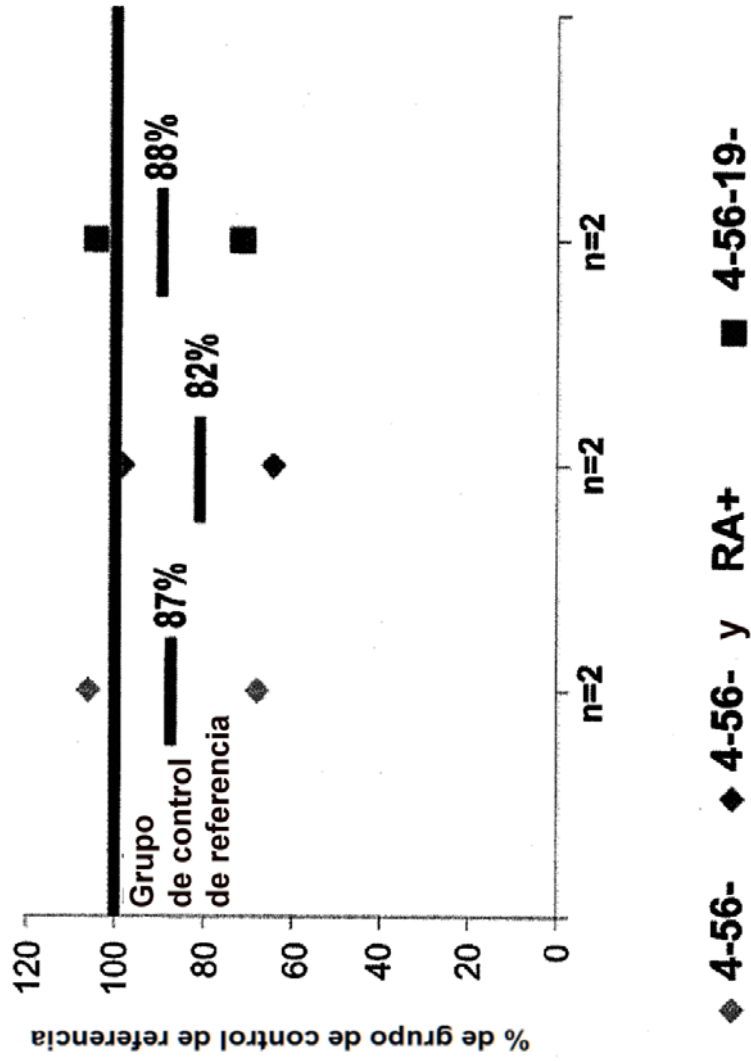


FIG. 21
Protocolo humano autólogo para la generación de Tcm

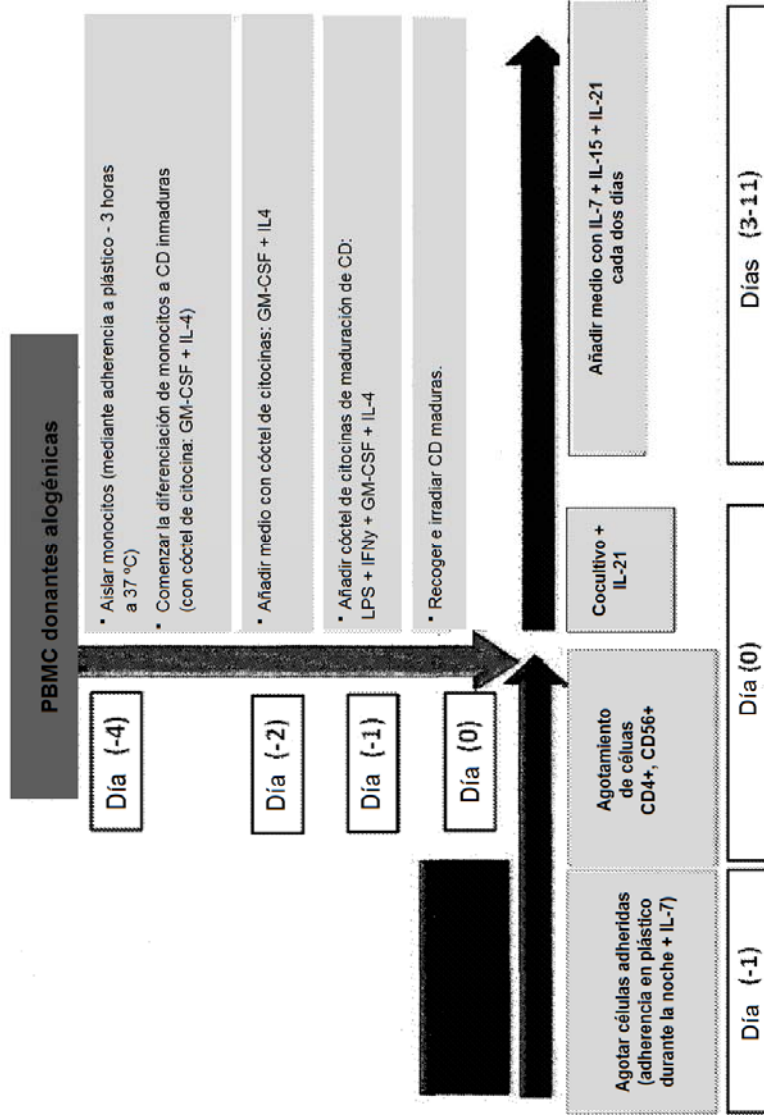
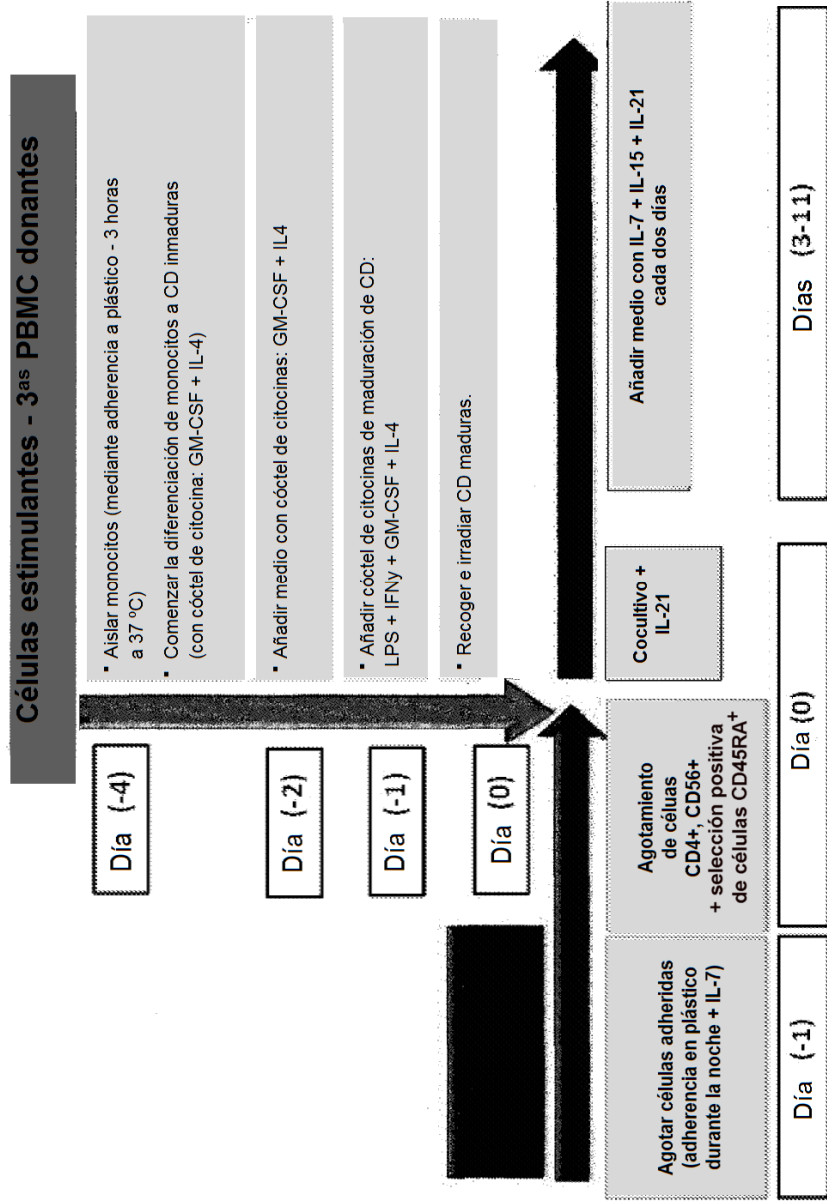
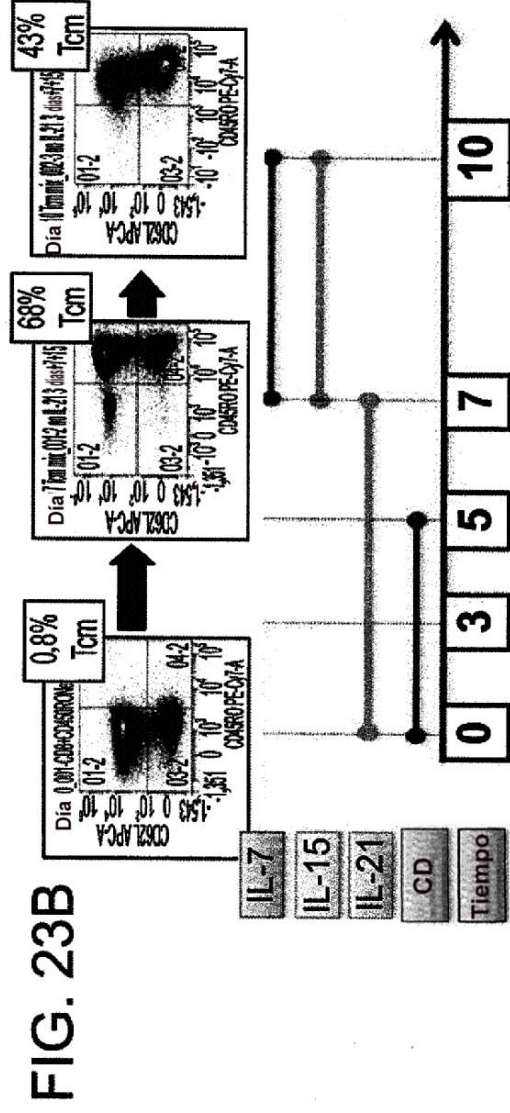
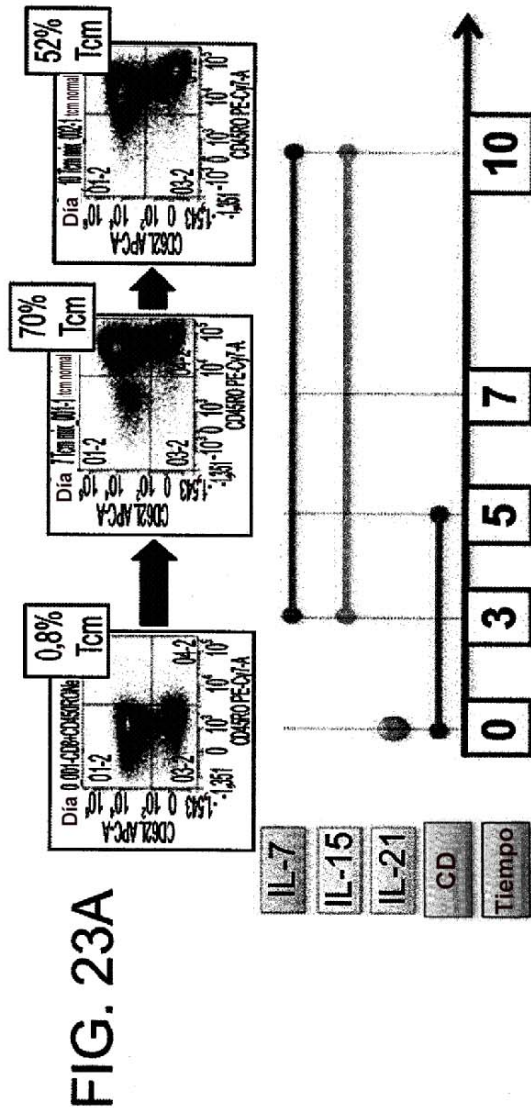


FIG. 22

Protocolo humano autólogo para la generación de Tcm





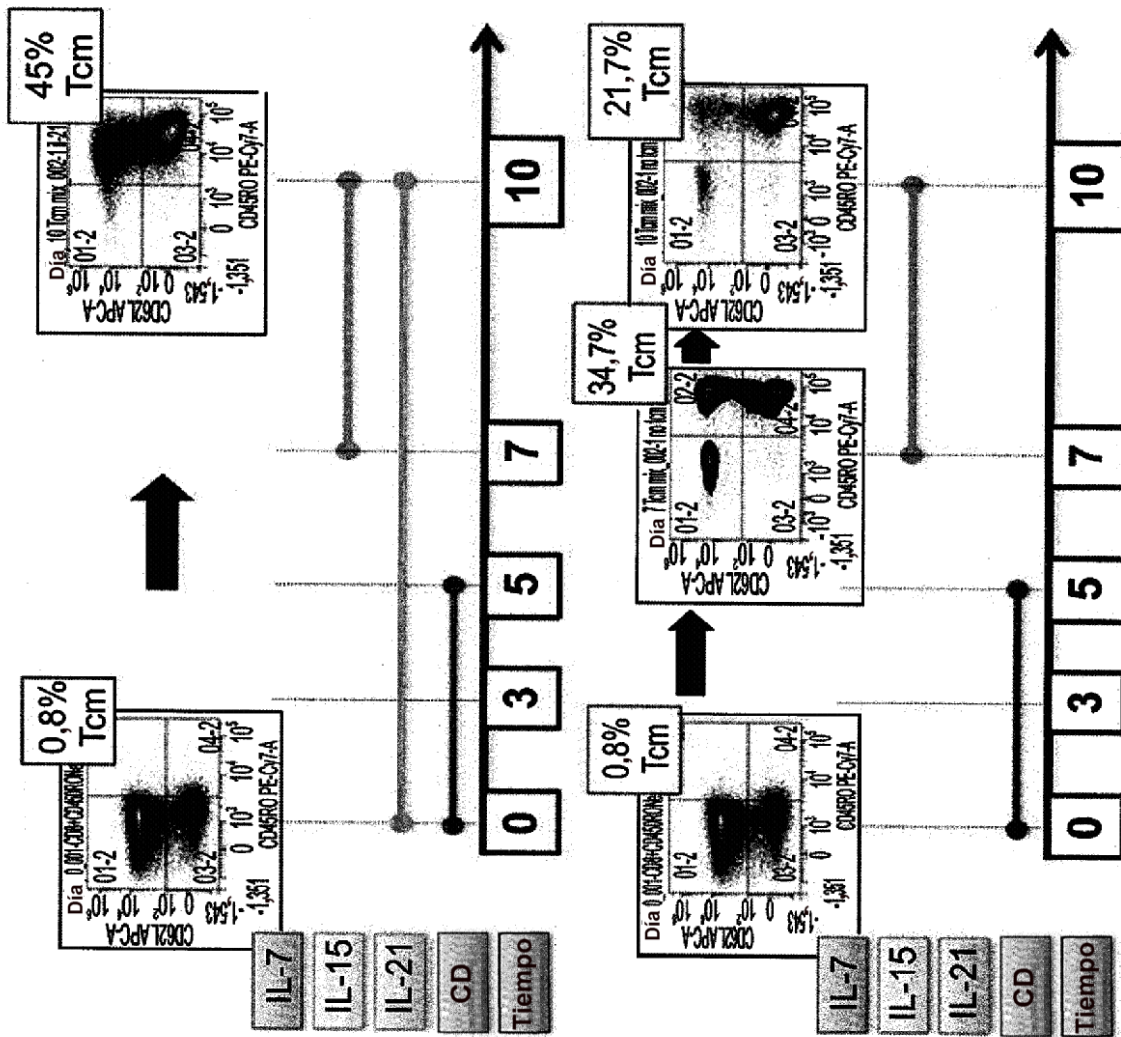


FIG. 23C

FIG. 23D

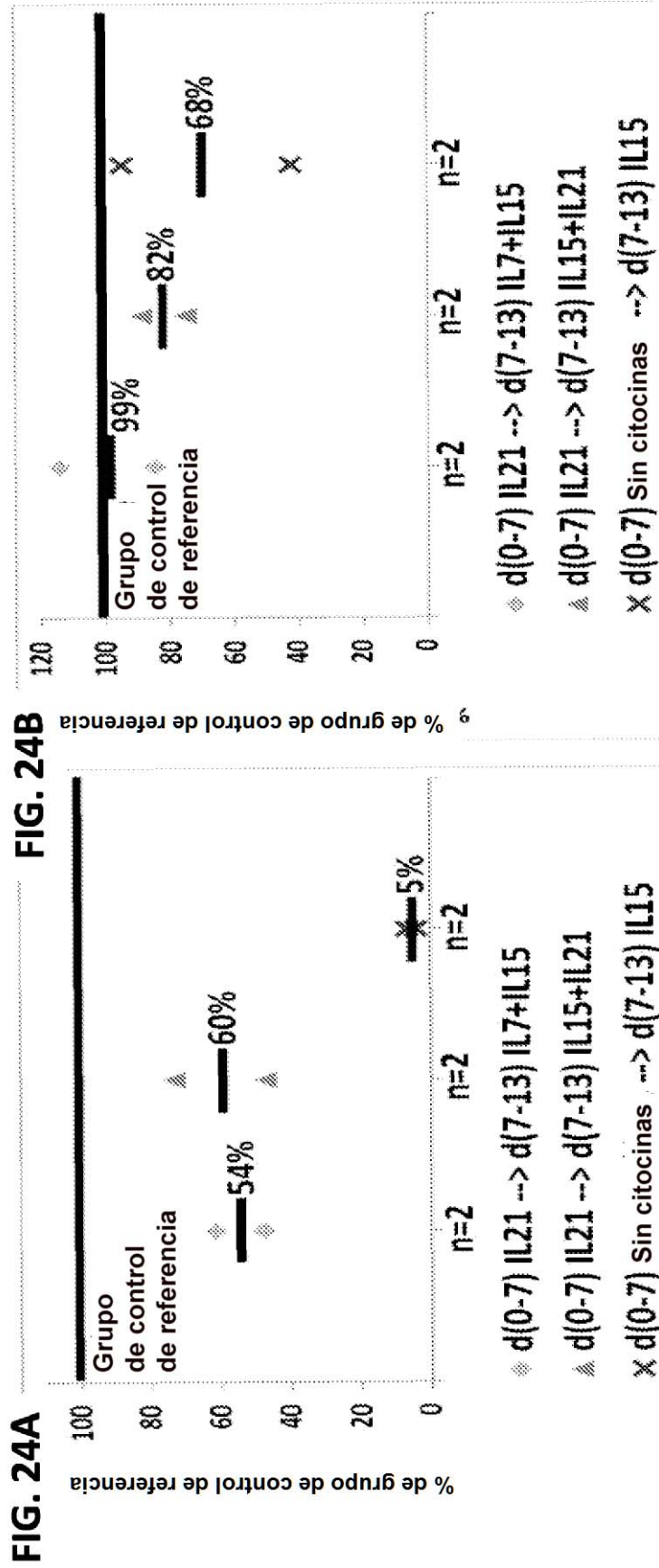


FIG. 25

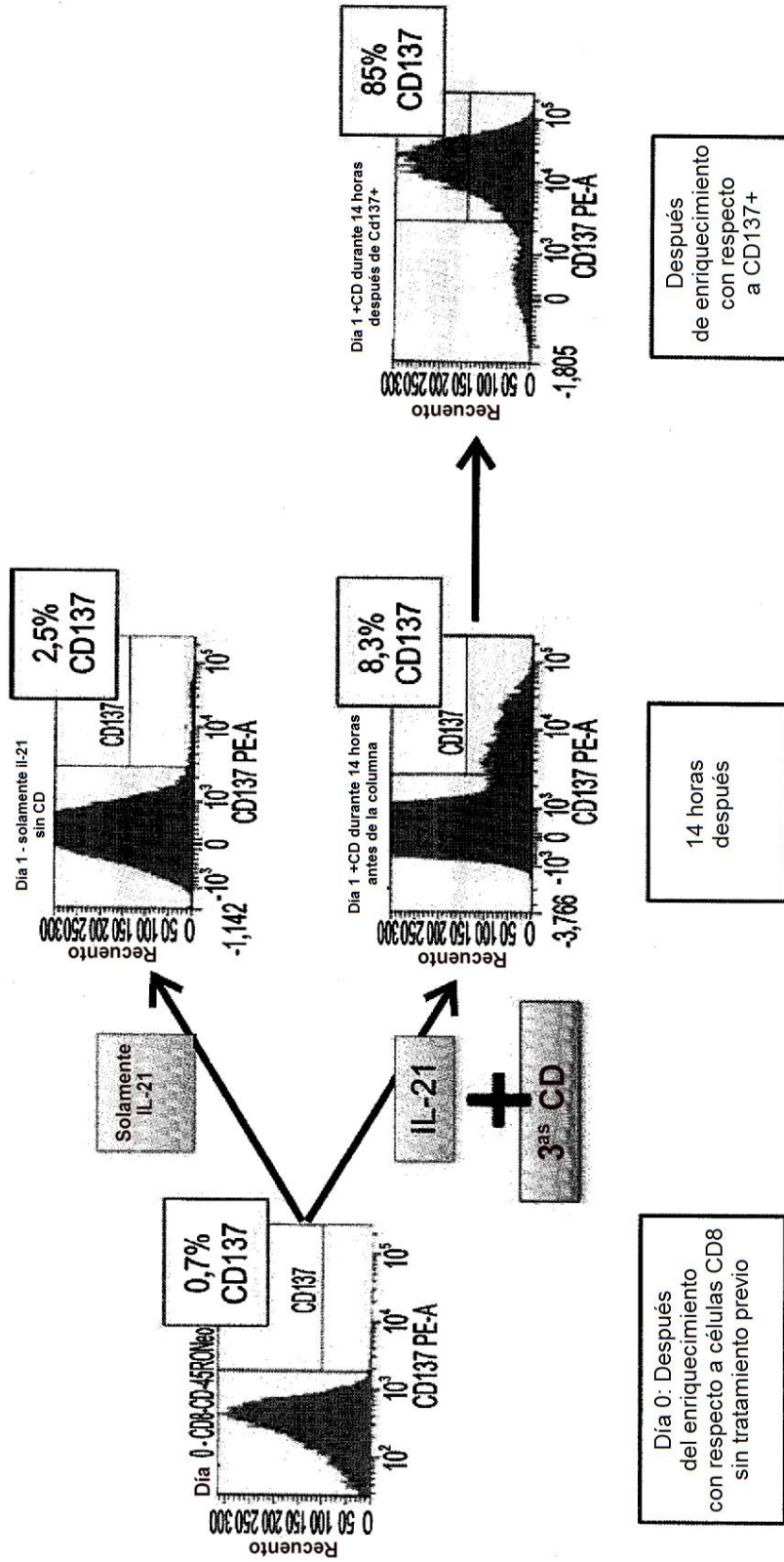


FIG. 26

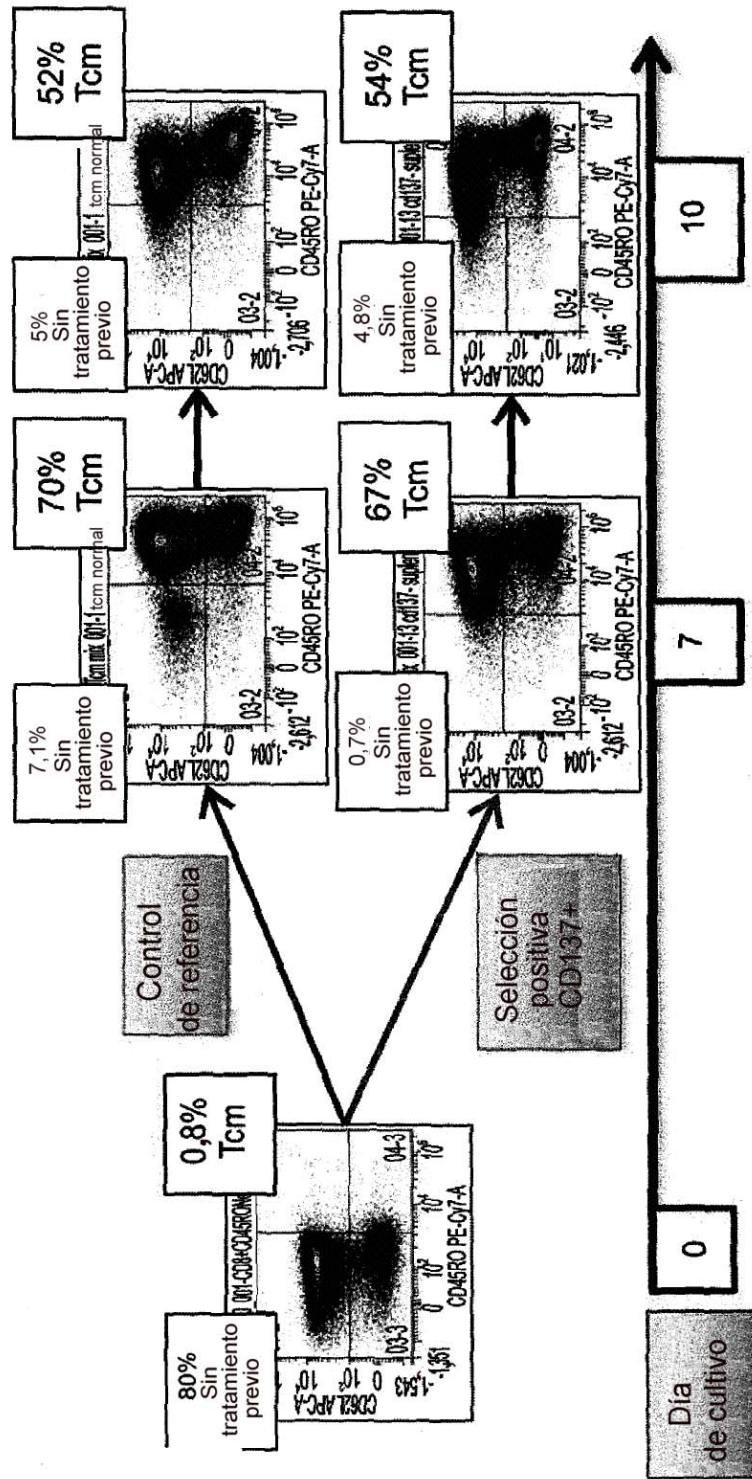


FIG. 27

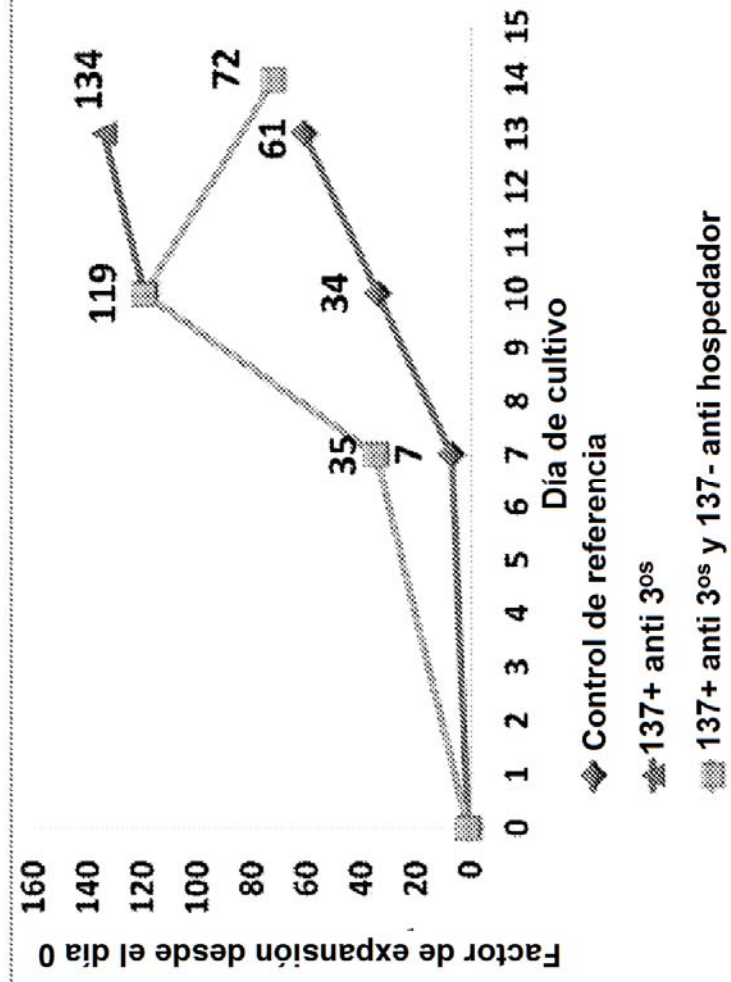


FIG. 28

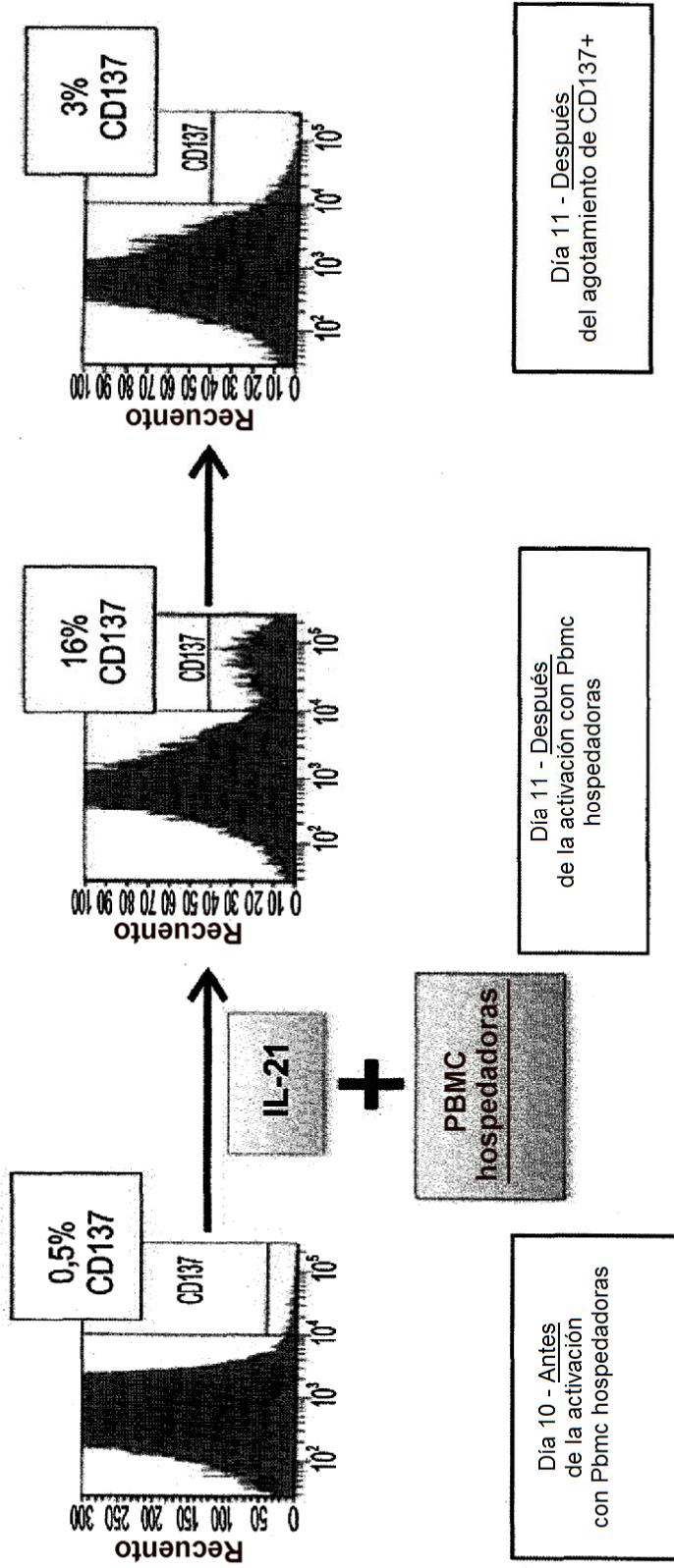


FIG. 29

