

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 756**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 35/26 (2015.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2012 PCT/EP2012/061041**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12171882**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2012 E 12732995 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2718426**

54 Título: **Preparaciones de células T de memoria-central específica de antígeno que tienen una alta fracción CD4+**

30 Prioridad:

11.06.2011 EP 11169655

12.08.2011 EP 11177524

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

19.03.2018

73 Titular/es:

VOLK, HANS-DIETER (33.3%)

Hegelplatz 1

10117, Berlin, DE;

SCHMÜCK, MICHAEL (33.3%) y

REINKE, PETRA (33.3%)

72 Inventor/es:

VOLK, HANS-DIETER;

SCHMÜCK, MICHAEL y

REINKE, PETRA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 659 756 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

Preparaciones de células T de memoria-central específica de antígeno que tienen una alta fracción CD4+

5 La presente invención se refiere a células T de memoria central específica de antígeno CD4+ y CD8+ para una terapia adoptiva de células T, y un método para proporcionar dichas células.

10 La generación de células T específicas de antígeno *in vitro* para el tratamiento de infecciones víricas graves y otras infecciones o enfermedades malignas ("terapia adoptiva") ayuda a la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz contra un antígeno, que dan como resultado una repuesta eficaz, idealmente la eliminación de la infección o enfermedad.

15 La transferencia celular adoptiva de linfocitos T citotóxicos (CTL) humanos autólogos y alogénicos, *ex vivo*, sensibilizados y expandidos ha aparecido como una estrategia prometedor para tratar tanto las enfermedades infecciosas como malignas en seres humanos.

20 Las células T tienen un papel central en el control de las infecciones patógenas y tumores. La respuesta insuficiente de células T se asocia en particular con un pobre control de virus y tumores asociados a virus, y también de otros agentes patógenos y tumores. La terapia adoptiva con células T es una nueva estrategia terapéutica prometedor para restablecer la inmunocompetencia.

25 Las infecciones por citomegalovirus (CMV) humano son la causa principal de morbilidad y mortalidad en individuos inmunocomprometidos y puede servir como un ejemplo de inmunidad mediada y control de la infección por células T. Una infección latente por CMV se mantiene clínicamente silente en una situación de inmunocompetencia; sin embargo, el CMV produce complicaciones frecuentes y graves en pacientes inmunocomprometidos, tal como los receptores de un trasplante. Debido a la inmunosupresión yatrogénica en estos individuos, la formación de respuestas de células T específicas de antígeno está muy limitada. Se desarrolló un protocolo basado en péptidos para generar líneas de células T específicas de CMV *ex vivo* (Hammer et al., Eur. J. Immunol. 2005, 35, 2250-2258). Este protocolo se basa en una estimulación a corto plazo con bibliotecas de agrupamientos peptídicos que cubren casi todos los epítomos CD4+ y CD8+ de células T de una determinada proteína (documento EP 1 257 290 B1).

35 He et al. (PLoS one 2011, Vol 6, e20107; documento WO2010/151517A2) muestra preparaciones de células T murinas derivados de células T intactas CD8+ aisladas, sensibilizadas –después del aislamiento- *in vitro* por péptido antigénicos en presencia de células dendríticas y altas concentraciones de rapamicina.

40 Letsch et al. (documento WO 2009/053109 A1) desvela medios y métodos para la generación de células T de memoria de larga duración específica de antígeno que son útiles para la terapia de transferencia adoptiva. Sin embargo, dichas células T de memoria solo pueden generarse de células derivadas de médula ósea por el método de Letsch et al.

45 La prueba de concepto clínica de esta estrategia se demostró recientemente (Brestrich et al., Am J Transplant, 2009). Las células T específicas de CMV autólogas generadas *in vitro* se infundieron en un paciente trasplantado de pulmón, que tenía una enfermedad por CMV resistente a fármacos antivirales grave y que estaba con ventilación mecánica a largo plazo. Las células T transferidas adoptivamente aclaró rápidamente la infección vírica y el paciente se recuperó en pocos días de la ventilación que había sido necesaria durante los meses previos. Después de la recuperación completa el paciente se dio de alta en la clínica tres semanas después de la infusión de células T. Después de siete semanas, el paciente tuvo una recaída inesperadamente. Se vieron datos similares en otros dos pacientes. Esto muestra notablemente que la adaptabilidad y potencial de esta estrategia, ya que se generaron satisfactoriamente células T específicas de CMV eficaces a partir de pacientes enfermos gravemente. De acuerdo con los datos experimentales la recaída se debe probablemente a la diferenciación tardía del fenotipo de las células T infundidas y por lo tanto su longevidad insuficiente *in vivo*.

50 Una población de células importante para la generación de memoria inmunitaria son las llamadas células de "memoria". Esta población se ha dividido adicionalmente en dos subpoblaciones, entre ellas las "células T de memoria efectoras (Tem) CD45RA- (negativas) CCR7- (negativas), y células de memoria central (Tcm) CD45RA-CCR7+. Se cree que las células que pertenecen a la subpoblación de memoria central son críticas para montar una respuesta inmunitaria eficaz al re-encontrarse con el antígeno.

60 Las células T de memoria/efectoras diferenciadas tardíamente tiene una potente función efectora pero no son capaces de establecer una memoria protectora de larga duración debido al potencial proliferativo disminuido y la corta supervivencia después del re-desafío. Por el contrario las células T de memoria/centrales diferenciadas tempranamente tienen menos función efectora citotóxica pero una fuerte capacidad proliferativa y un periodo de vida más largo. Se espera que las células T efectoras derivadas de memoria central presenten una infiltración de duración superior. La persistencia de las células transferidas se correlaciona con la eficacia terapéutica. El equilibrio de la capacidad de infiltración con una fuerte función efectora específica de antígeno puede dar lugar a un resultado terapéutico óptimo. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar líneas de células T capaces de

un fuerte potencial de infiltración después de la transferencia adoptiva. Este objetivo se alcanza por los métodos y preparaciones de la presente invención.

5 Durante los experimentos con el objetivo de mejorar la infiltración y actividad de las células T transferidas adoptivamente, se descubrió sorprendentemente que la modificación de la señalización intracelular de IL-2 por inhibición parcial de mTOR durante la fase de expansión de una línea celular T específica de antígeno aumentaba fuertemente la respuesta de células T anti-patógena/tumoral y, de manera más importante, mantiene un fenotipo celular de memoria/efector temprano que se ha descrito que está asociado con una eficacia de larga duración *in vivo*.

10 En el presente documento, "CD45RA" significa un marcador de linfocitos T intactos humanos (PTPRC; Uniprot ID P07585; isoforma A) y CCR7 significa el receptor 7 de quimiocina humana (Uniprot ID P32248).

15 Si cualquier población celular se designa como "positiva" con respecto a cierto marcador proteico, esta designación significará que dicha población celular se puede teñir por un anticuerpo marcado con un colorante fluorescente común contra el marcador proteico y dará lugar a una señal fluorescente de una intensidad al menos un log mayor en comparación con células sin marcar o células marcadas con el mismo anticuerpo pero que se sabe comúnmente que no expresan dicho marcador proteico.

20 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para generar preparaciones de células T que son específicas para al menos un antígeno diana. Este método comprende las siguientes etapas:

- se expanden células linfoides *in vitro* en presencia de uno o más antígenos diana o fragmentos peptídicos de los mismos en una etapa de expansión, dando lugar a una primera preparación de células T; después
- 25 - las células que responden se aíslan de la primera preparación de células T en una etapa de aislamiento, dando lugar a una segunda preparación de células T; después
- en una etapa de cultivo, las células obtenidas en la segunda preparación de células T se cultivan en presencia de una citocina estimulante del crecimiento y diferenciación de células inmunitarias, preferentemente la interleucina 2 y/o interleucina 7, y un inhibidor del complejo mTOR, preferentemente rapamicina o un análogo de rapamicina
- 30 tales como, a modo de ejemplo no limitante, SDZ-RAD (Everolimus).

La etapa de expansión, la etapa de aislamiento y la etapa de cultivo se ejecutan en la secuencia descrita.

35 Las células que responden en el sentido de la invención son células que secretan al menos uno de entre interferón gamma, interleucina 2, o factor de necrosis tumoral alfa, o células que expresan CD137 o CD40L a continuación del desafío. La preparación de células T se cultiva en presencia de una citocina, por ejemplo IL2 o IL7. Otros ejemplos son IL15 o IL21. Se prefiere una combinación de IL2 e IL7.

40 En una realización, las células que responden se seleccionan en la etapa de aislamiento basándose en su secreción de interferón gamma. Las células que son positivas a la secreción de IFN gamma se incluyen en la segunda preparación de células T.

45 En una realización, el antígeno diana es CMV, particularmente antígenos inmunodominantes pp65 o IE1 como péptido completo o como bibliotecas de péptidos que representan todos o epítopos seleccionados del mismo.

50 En una realización, la etapa de aislamiento se lleva a cabo separando las células magnéticamente o por citometría de flujo, por ejemplo, asándose en su unión a un anticuerpo unido directa o indirectamente a una perla magnética o colorantes fluorescentes. El anticuerpo que se utiliza en los ejemplos de la presente invención es bivalente y reconoce una citocina (por ejemplo: IFN gamma, interleucina 2, factor de necrosis tumoral alfa) y un antígeno de superficie celular (ensayo de secreción de citocinas), o se une directamente a la superficie mediante la activación de marcadores CD137 o CD40L. Se prefiere un anticuerpo bivalente que reconoce IFN gamma y un antígeno de superficie celular específico de leucocitos tales como CD45. El kit disponible en el mercado (ensayo de secreción de IFN gamma; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania) separa las células por retención selectiva en un campo magnético mediante un anticuerpo unido a una perla magnética. El anticuerpo se une al IFNg unido a la superficie celular por un anticuerpo bivalente.

60 En algunas realizaciones, la concentración del inhibidor del complejo mTOR 1 está entre 2 y 20 nmol/l. En algunas realizaciones, la concentración del inhibidor del complejo mTOR 1 está entre 10 y 20 nmol/l. En algunas realizaciones la concentración del inhibidor del complejo mTOR 1 está entre 5 y 20 nmol/l. En algunas realizaciones la concentración del inhibidor del complejo mTOR 1 está entre 2 y 8 nmol/l. En algunas realizaciones la concentración del inhibidor del complejo mTOR 1 es aproximadamente de 2, 4, 6, 8 o 10 nmol/l. El empleo de una concentración baja o muy baja del inhibidor de mTOR (por ejemplo, rapamicina) da lugar a una funcionalidad CD4+ significativamente mejor en la preparación de células T resultante. La funcionalidad CD4+ mejorada da lugar a una proliferación de memoria central CD4+ mejorada, que da como resultado una mejora general de respuesta de células T a largo plazo incluyendo la respuesta CD8+. Las concentraciones bajas de rapamicina también evitan el sobre-crecimiento de células T CD8+ en la preparación de células T. Las preparaciones del estado de la técnica

(véase He et al., *ibid.*) enfatiza el efecto de las altas concentraciones de rapamicina sobre la funcionalidad CD8+ a corto plazo, sin tener en cuenta las desventajas que resultan de la falta de función de CD4+ a largo plazo y que resultan de las altas concentraciones de rapamicina durante el cultivo.

5 En algunas realizaciones, las células linfoides son células mononucleares de sangre periférica completas obtenidas de un paciente humano.

En algunas realizaciones, la etapa de cultivo dura entre 10 y 25 días, particularmente entre 15 y 21 días, más particularmente alrededor de 18 días.

10 Por el método de la invención, se proporciona es obtenible una preparación de células T que se diferencia de las preparaciones informadas previamente en su composición, particularmente en que las células que constituyen la preparación se han seleccionado por la secreción de IFN gamma, interleucina 2 o factor de necrosis tumoral alfa o por la expresión de CD137 o CD40L posteriormente a la estimulación con el antígeno, y que se han cultivado o propagado en presencia de un mTOR, de manera que se sesgan significativamente los repertorios de células T de memoria efectora/memoria central y CD4/CD8 de la preparación en comparación con preparaciones obtenidas en vivo, sin tratamiento inhibitorio o sin una estimulación o selección previa.

20 La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención puede caracterizarse por la característica de que la relación de células que expresan CD8 respecto a las células que expresan CD4 en la preparación es menor (<) de 6, < 4,5 o alrededor de 4.

25 La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención se puede caracterizar también por un porcentaje de células CD45RA- y CCR7+ (en relación a todas las células CD4 y CD8 positivas de la preparación) mayor (>) del 10 %, > 15 %, o > 20 %.

30 La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención también puede caracterizarse por las características de la relación de células CD4+, CCR7+ y CD45RA- (CM) respecto a células CD4+, CCR7- y CD45RA- (EM) es > 3 o >1.

35 La preparación que se puede obtener por el método de la invención también se puede caracterizar por las características en la que el porcentaje de células que son CD4+, CCR7+ y CD45RA- (CM/células de memoria central), calculado en referencia a la suma de células CD4+ y células CD8+ en el cultivo, es >15 %, >20 %, o >25 %.

40 La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención también se puede caracterizar por la característica de que la relación (porcentaje) de células CD8+, CCR7+ y CD45RA- (CM) en referencia a la suma de células CD4+ y células CD8+ en el cultivo, es > 5 %, > 7,5 % o > 9 %.

45 La provisión de una preparación de células T con una relación relativamente alta de células de memoria central que expresan CD4 tiene gran valor para cualquier aplicación de las mismas, especialmente para tratar la enfermedad por CMV por transferencia adoptiva de la preparación de células T.

Una fracción mayoritaria de células en la preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención puede expresar CCR7, CD62L y muestra una expresión prolongada de CD127 durante los primeros 2, 3, 4, 5 o 6 días de la etapa de cultivo.

50 El ensayo de captura de IFN gamma suministrado por las células CD4+ que representan predominantemente un fenotipo T intacto y TCM sin embargo, las células T CD8+ muestran un fenotipo T (intacto), TEM y de célula T de memoria terminal diferenciada (TEMRA). TEMRA así como TEM secretaban la mayoría de IFN gamma.

55 La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención también puede caracterizarse por tener una relación de células que expresen todos los IFN γ , TNF α e IL-2 más del (>) 10 % a continuación de la estimulación antigénica específica (en relación con todas las células positivas a CD4 o CD8 de la preparación). Los datos se muestran el Fig. 11.

También, una preparación preparada por un método de acuerdo con un primer aspecto de la invención se puede caracterizar por las características de

- 60 - la relación de células que expresan CD8 respecto a las células que expresan CD4 (CD8:CD4) en la preparación es menor de (<) 6; y
- la relación de células CD4+, CCR7+ y CD45RA- (CM) respecto a las células CD4+, CCR7- y CD45RA- (EM) es > 3; y
- la relación de células CD8+, CCR7+ y CD45RA- (CM) respecto a las células CD8+, CCR7- y CD45RA- (EM) es > 1; y
- 65 - en relación con la suma de células positivas a CD4 y CD8 de la preparación, el porcentaje de células CD45RA- y CCR7+ es mayor del (>) 10 %, y el porcentaje de células que expresan todos de IFN γ , TNF α e IL-2 es mayor del

(>) 10 %.

La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención puede caracterizarse también por las características de

- 5
- la relación de CD8:CD4 en la preparación es < 5, y
 - la relación de células CD4+CM respecto a células CD4+EM es > 3; y
 - la relación de células CD8+CM respecto a las células CD8+EM es > 1; y
- 10
- en relación con la suma de células positivas a CD4 y CD8 de la preparación, el porcentaje de células CD45RA- y CCR7+ es > 20 %, y el porcentaje de células que expresan todos de IFN γ , TNF α e IL-2 es mayor del (>) 10 %.

La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención también se puede caracterizar por las características de

- 15
- la relación de CD8:CD4 en la preparación es < 4,5, y
 - la relación de células CD4+CM respecto a células CD4+EM es > 3; y
 - la relación de células CD8+CM respecto a las células CD8+EM es > 1; y
- 20
- en relación con la suma de células positivas a CD4 y CD8 de la preparación, el porcentaje de células CD45RA- y CCR7+ es > 20 %, y el porcentaje de células que expresan todos de IFN γ , TNF α e IL-2 es mayor del (>) 10 %.

La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención también se puede caracterizar por las características de

- 25
- la relación de CD8:CD4 en la preparación es < 4,5, y
 - la relación de células CD4+CM respecto a células CD4+EM es > 3; y
 - la relación de células CD8+CM respecto a las células CD8+EM es > 1; y
- 30
- en relación con la suma de células positivas a CD4 y CD8 de la preparación, el porcentaje de células CD45RA- y CCR7+ es > 20 %, y el porcentaje de células que expresan todos de IFN γ , TNF α e IL-2 es mayor del (>) 10 %.

La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención también se puede caracterizar por las características de

- 35
- la relación de CD8:CD4 en la preparación es alrededor de 4, y
 - la relación de células CD4+CM respecto a células CD4+EM es > 3; y
 - la relación de células CD8+CM respecto a las células CD8+EM es > 1; y
- 40
- en relación con la suma de células positivas a CD4 y CD8 de la preparación, el porcentaje de células CD45RA- y CCR7+ es > 20 %, y el porcentaje de células que expresan todos de IFN γ , TNF α e IL-2 es mayor del (>) 10 %.

La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención también se puede caracterizar por las características de

- 45
- la relación de CD8:CD4 en la preparación es < 6; y
 - el porcentaje de las células CD45RA- y CCR7+ es mayor del (>) 10 %, y
 - el porcentaje de las células CD4+, CCR7 y CD45RA- (CM) es > 15 %; y
- 50
- el porcentaje de las células CD8+, CCR7+ y CD45RA- (CM) es > 7 %, cada uno de dichos porcentajes se calcula en referencia a la suma de todas las células CD4+ y las células CD8+ de la preparación.

La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención también se puede caracterizar por las características de

- 55
- la relación de CD8:CD4 en la preparación es < 5; y
 - el porcentaje de las células CD45RA- y CCR7+ es > 20 %, y
 - el porcentaje de las células CD4+, CCR7 y CD45RA- (CM) es > 15 %; y
- 60
- el porcentaje de las células CD8+, CCR7+ y CD45RA- (CM) es > 7 %, cada uno de dichos porcentajes se calcula en referencia a la suma de todas las células CD4+ y las células CD8+ en la preparación.

La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención también se puede caracterizar por las características de

- 65
- la relación de CD8:CD4 en la preparación es < 4,5; y
 - el porcentaje de las células CD45RA- y CCR7+ es > 20 %, y
 - el porcentaje de las células CD4+, CCR7 y CD45RA- (CM) es > 15 %; y
- 70
- el porcentaje de las células CD8+, CCR7+ y CD45RA- (CM) es > 7 %, cada uno de dichos porcentajes se calcula en referencia a la suma de todas las células CD4+ y las células CD8+

en la preparación.

La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención también se puede caracterizar por las características de

- 5
- la relación de CD8:CD4 en la preparación es < 5 ; y
 - el porcentaje de las células CD45RA- y CCR7+ es > 20 %, y
 - el porcentaje de las células CD4+, CCR7 y CD45RA- (CM) es > 15 %; y
 - el porcentaje de las células CD8+, CCR7+ y CD45RA- (CM) es > 7 %,

10 cada uno de dichos porcentajes se calcula en referencia a la suma de todas las células CD4+ y las células CD8+ en la preparación.

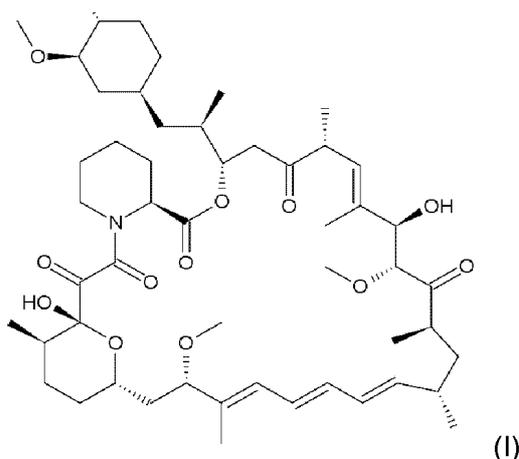
Cualquiera de las realizaciones se describen en el presente documento en referencia a detalles de una característica en particular, o varias características, sin describir todas las características de la invención hasta el último detalle, dichas realizaciones significan que son capaces de combinarse para dar lugar a realizaciones particulares de la presente invención.

La preparación de células T que se puede obtener por el método de la invención se puede utilizar como un medicamento, particularmente para el uso en la prevención o terapia de una enfermedad infecciosa o cáncer. Las preparaciones de células T que se proporcionan en el presente documento son de utilidad particular en paciente que se someten o se han sometido a trasplante de un órgano sólido, especialmente en la prevención o terapia de una enfermedad infecciosa o cáncer.

Aunque se han asignado características antigénicas a varios tumores; el melanoma maligno es un ejemplo. El método y la composición de la presente invención que se puede obtener de esta manera será útil para pacientes que sufren de dichas entidades tumorales. Se proporcionan ventajas particulares en indicaciones para tumores asociados a virus. El linfoma asociado al virus de Epstein Barr (EBV), tal como una enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (PLTD) en pacientes inmunocomprometidos, es un ejemplo típico. La transferencia adoptiva de células T específicas de EBV combaten satisfactoriamente la PLTD en estrategias terapéuticas y preventivas. Sin embargo, al igual que la terapia adoptiva con células T específicas de CMV, la eficacia a largo plazo se ha observado en aproximadamente el 50 % de pacientes trasplantados solo. El análisis fenotípico revelaba una dominancia del fenotipo Tem tardío en el producto de células T así como sugería la necesidad de enriquecimiento de células Tcm de larga duración para mejorar los efectos a largo plazo en todos los pacientes.

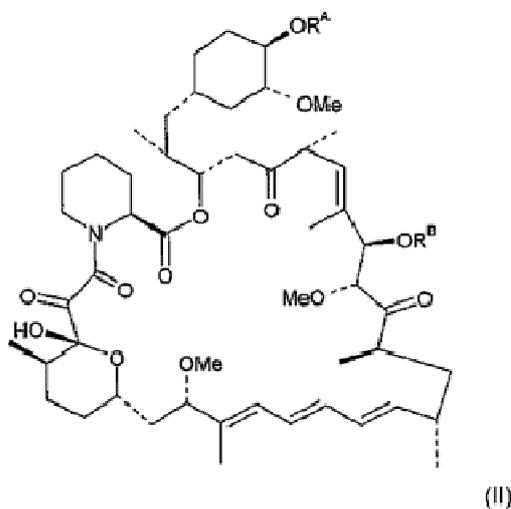
Los efectos impresionantes descritos en las Figuras y Ejemplos demuestran la utilidad de la modificación de la señalización de IL-2 por inhibición intracelular de mTOR (diana en mamíferos de la Rapamicina, Gene ID: 2475) durante la fase de expansión del cultivo, que aumenta fuertemente las respuestas de células T y mantiene un fenotipo de memoria/efector temprano sin afectar significativamente la expansión clónica que identifica la modificación parcial de la señalización de IL-2 para ser responsable de este efecto. Por lo tanto, la modificación de la señalización de IL-2 da lugar a este efecto. La calidad y durabilidad de las respuestas de células T CD8+ antivíricas mediadas por CD4- estaban significativamente aumentadas. La dosis del agente para el Sirolimus (Rapamicina), como sustancia modelo de un inhibidor del mTOR, no debe exceder de 20 nM, de otra manera el efecto es el opuesto. Se han establecidos materiales de calidad clínica; por lo tanto la generación de Tcm autólogos es una estrategia que se puede conseguir con calidad clínica. El sirolimus está aprobado para su uso clínico (inmunosupresión), haciendo posible su uso. Se llevaron a cabo experimentos de titulación con una dosificación del fármaco alta/normal que se utiliza en clínica, demostrando las propiedades inmunosupresoras cuando el crecimiento de células T se inhibía completamente. Las líneas de células T tratadas presentan una expresión prolongada estadísticamente significativa de los marcadores de superficie celular CD127, CCR7 y CD62L, que caracteriza un fenotipo específico de células de memoria/central. Una característica específica de las células T de memoria/central es la capacidad de secretar grandes cantidades de IL-2 después de la estimulación con antígeno. *In vivo* estos es crucial para su activación autocrina que da como resultado la proliferación. En comparación con el espécimen sin tratar, las líneas de células T generadas muestran una mayor secreción de IL-2 entre la secreción de citocinas efectoras, después de la estimulación. En este cuadro experimental, el Sirolimus aumenta la cantidad y calidad de células T específicas de virus *in vitro*. Las líneas de células T mostraban una lisis específica dependiente de la dosis de las dianas cargadas con péptido y aumentaba la secreción de citocinas. De manera notable, la inhibición equilibraba significativamente la relación CD4/CD8, que daba lugar consecutivamente a una respuesta CD8 antivírica *in vitro*. El tratamiento con Sirolimus aumentaba la proporción de células T CD4+ en el cultivo, dando como resultado una fuerte respuesta efectora de células T CD8+ específica de antígeno. Es de señalar que las células T específicas de CMV tratadas no muestran diferencias en lisis de diana específica, excluyendo una influencia negativa de los fármacos sobre la funcionalidad. Este estudio revela una estrategia potente para generar células T específicas de antígeno con una alta capacidad funcional y puede que una robusta persistencia a largo plazo *in vivo*.

Como se define en el presente documento, el término "rapamicina" define una clase de compuestos inmunosupresores que contienen el núcleo básico de rapamicina caracterizado por una fórmula I.



- Las rapamicinas de la presente invención incluyen compuestos, que pueden modificarse química o biológicamente como derivados del núcleo de rapamicina, mientras que mantienen las propiedades inmunosupresoras. En consecuencia, el término "rapamicina" incluye, ésteres, éteres, oximas, hidrazonas e hidroxilaminas de rapamicina, así como rapamicinas en las que los grupos funcionales de la rapamicina se han modificado, por ejemplo, mediante la reducción u oxidación. El término "rapamicina" también incluye sales farmacéuticas aceptables de rapamicinas, que son capaces de formar dichas sales, gracias o que contienen un resto ácido o básico.
- 5 Se prefiere que los ésteres o éteres de rapamicina sean de los grupos hidroxilo en la posición 42 y/o 31 del núcleo de rapamicina, ésteres y éteres de un grupo hidroxilo en la posición 27 (después de la reducción química de la cetona 27), y que las oximas, hidrazonas, e hidroxilaminas sean de una cetona en la posición 42 (después de la oxidación del grupo hidroxilo 42) y de la cetona 27 del núcleo de la rapamicina.
- 15 Los ésteres y éteres en 42 y/o 31 preferidos de rapamicina se desvelan en las siguientes patentes, alquil ésteres (US 4.316.885); aminoalquil ésteres (US 4.650.803); ésteres fluorados (US 5.100.883); aminoésteres (US 5.130.307); amino-diésteres (US 5.162.333); ésteres amino alcanóicos (US 5.389.639); amido ésteres (US 5.118.677); silil ésteres (US 5.120.842); acetales (US 5.51.413); ésteres de sulfonato y sulfato (US 5.177.203); ésteres (US 5.221.670); alcoxi ésteres (US 5.233.036), O-aril, -alquil, -alquénil y -alquínil éteres (US 5.258.389),
- 20 carbonate ésteres (US 5.260.300); arilcarbonyl y alcoxi-carbonyl carbamatos (US 5.262.423); hidroxieésteres (US 5.362.718); ésteres con impedimentos estéricos (US 5.385.908); ésteres heterocíclicos (US 5.385.909); ésteres gem-disustituídos (US 5.385.910); ésteres de fosforilcarbamato (US 5.391.730); ésteres de amidino carbamato (US 5.463.048); carbamatos (US 5.302.584); ésteres de carbamato (US 5.411.967; US 5.434.260; US 5.480.988; US 5.480.989; US 5.489.680; US 5.118.678); N-oxide ésteres con impedimentos (US 5.491.231), ésteres de biotina (US 5.504.091); O-alquil éteres (US 5.665.772); y PEG ésteres de rapamicina (US 5.780.462). La preparación de estos
- 25 compuestos se desvela en las patentes enumeradas anteriormente.

En consecuencia, los ejemplos de la rapamicina incluyen compuestos caracterizados por la fórmula general II



30

en la que R^A y R^B se seleccionan cada uno de entre hidrógeno y ésteres o éteres que forman los grupos desvelados en cualquiera de las patentes mencionadas anteriormente.

Los ésteres y éteres en 27 de rapamicina se desvelan en el documento US 5.256.790. La preparación de estos ésteres y éteres se desvela en la patente mencionada anteriormente.

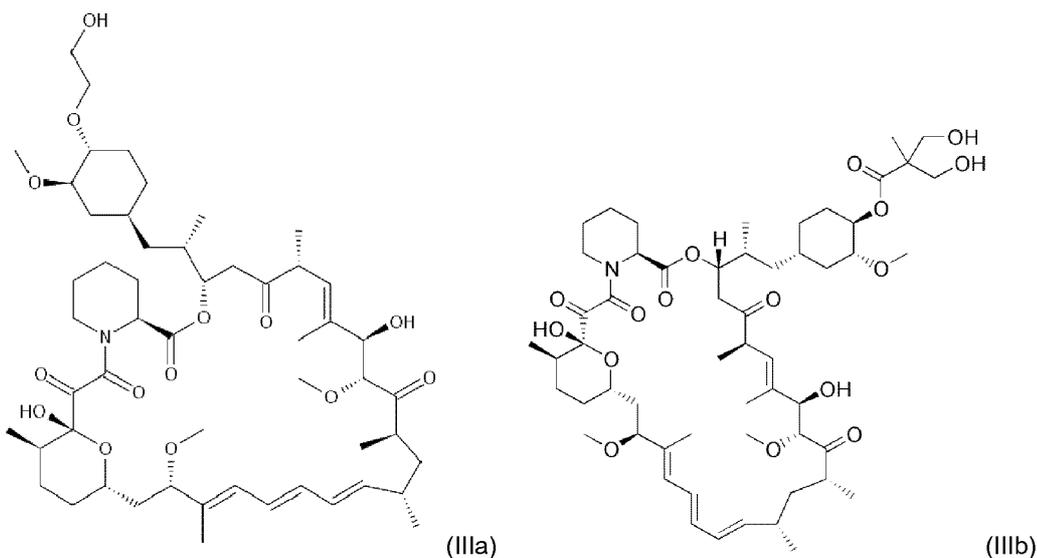
Las oximas, hidrazonas e hidroxilaminas preferidas de la rapamicina se desvelan en los documentos US 5.373.014, US 5.378.836, US 5.023.264 y US. La preparación de estas oximas, hidrazonas e hidroxilaminas se desvelan en las patentes enumeradas anteriormente.

Las rapamicinas particularmente preferidas incluyen la rapamicina (documento US 3.929.992) éster 42 de rapamicina con ácido 3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropiónico (documento US 5.362.718) y 42-O-(2-hidroxi)etil rapamicina (documento US 5.665.772).

Cuando se aplican, se pueden formar sales farmacéuticas aceptables a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, acético, propiónico, láctico, cítrico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, ftálico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metanosulfónico, naftalenosulfónico, benenosulfónico, toluenosulfónico, canforsulfónico y ácidos aceptables conocidos de manera similar cuando la rapamicina contiene un resto básico adecuado. Las sales se pueden formar también a partir de bases orgánicas e inorgánicas tales como sales alcalinometálicas (por ejemplo sodio, litio, o potasio), sales metálicas alcalinotérricas, sales de amonio, sales de alquilamonio, que contienen 1 a 6 átomos de carbono o sales de dialquilamonio que contienen 1 a 6 átomos de carbono en cada grupo alquilo y sales de trialquilamonio que contienen 1 a 6 átomos de carbono en cada grupo alquilo, cuando la rapamicina contiene un resto ácido adecuado.

Los inhibidores preferidos de mTOR son:

- Sirolimus (número CAS 53123-88-9), también conocido como rapamicina,
- Everolimus (IIIa; número CAS 159351-69-6), que es un derivado 40-O-(2-hidroxi)etil de rapamicina,
- Temsirolimus (IIIb; número CAS 162635-04-3).



Los números de ID de Gen en el presente documento se refiere a entradas en la base de datos Genéticos del Centro Nacional de Estados Unidos para Información Biotecnológica.

Ejemplos

Configuración experimental

Protocolos para la expansión y selección siguiendo las técnicas publicadas en el documento WO2009/053109.

Las células T específicas de CMV se enriquecieron y se expandieron utilizando una técnica descrita previamente (Becker et al., Nat. Med. 2001, 7, 1159-62). En resumen, se estimularon 4×10^7 PBMC autólogas durante 6 horas con 1 ug/ml de agrupamiento peptídico solapado de fosfoproteína 65 de citomegalovirus humano (pp65) y proteína inmediata temprana 1 (IE1) (JPT Peptide Technologies). El agrupamiento consistía en péptidos 15-meros solapados por 10 aminoácidos y se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO). Las células productoras de IFN γ sometidas a selección positiva por el sistema de captura de IFN γ (Miltenyi Biotech) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Las células IFN γ + se cultivaron a continuación durante 18 días en placas de 24 pocillos junto con 10^7 PBMC autólogas radiadas utilizando RPMI 1640 suplementado con un 10 % de suero bovino fetal, un 1 % de Penicilina/Estreptomina (Biochrom) y 50 U/ml de rIL2 (Chiron) y 10 ng/ml de rIL7 (Cellgenix) o solo cuando se

indicaba de alguna forma. Cuando se indica, se añadieron un inhibidor de mTOR (sirolimus, Sigma-Aldrich) y dosis muy baja (VLD, 2 nM) y baja dosis (LD, 20 nM) o antagonista del receptor IL-2 (Basiliximab, Simulect, Novartis) a 20 µg/ml desde el día 1 cada dos días junto con la suplementación de medio posterior,

5 Evaluación de la actividad citotóxica

Se utilizaron como dianas monocitos diferenciados infectados con la cepa NEWT de tipo silvestre de laboratorio relacionada con el CMV. Para imitar la infección por CMV, se pulsaron LCL autólogos con 1 µg/ml de agrupamientos de péptidos CMVpp65/IE-1 solapados, mientras que los LCL no pulsados representaban dianas no infectadas. Las dianas se marcaron con 10 µM de succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFDA-SE Molecular Probes). Como controles se marcaron LCL no pulsados y monocitos diferenciados (Fibroblastos incubados) con 5 µM de óxido de dimetildodecilamina – succinimidil éster (Far Red: Invitrogen). Las células se co-cultivaron durante 16 h en una relación de célula T/diana de 10:1. Se analizaron las sondas por triplicado utilizando un citómetro de flujo LSR-II. Las muestras sin células T que contenían solo APC (pulsadas/NEWT o no pulsadas) representaban el control interno. Se reguló el análisis sobre células negativas al colorante con una tinción de discriminación viva/muerta (colorante reactivo fluorescente near-IR, Invitrogen). Se calculó el porcentaje medio de supervivencia de las dianas pulsadas o infectadas con NEWT con respecto a los controles no pulsados con antígeno. La actividad lítica en porcentaje de lisis de dianas se calculó de la siguiente manera: porcentaje medio de supervivencia de las dianas en un cultivo que contiene un número definido de células T efectoras en comparación con células de control sin células T. Véase también I. F. Hermans et al., *Journal of immunological methods* 285, 25 (1 Feb, 2004).

Tinción de citocinas intracelulares

A continuación de la estimulación específica de antígeno, se determinó la secreción de citocinas (IFN γ , TNF α e IL-2) y la expresión de marcadores de activación (CD137 y CD154) por tinción fluorescente intracelular. Todos los anticuerpos se adquirieron en Becton Dickinson (BD), excepto donde se indica. Los monocitos infectados con virus y LCL o monocitos cargados con el agrupamiento peptídico (1 µg/ml IE-1/pp65) se añadieron a las células T con una relación de dilución de 1:10. Los LCL o monocitos no pulsados (incubados en DMSO) representan el control no estimulado. Para la detección de citocinas efectoras, las células T cultivadas se re-estimularon durante 18 h en presencia de 1 µg/ml de brefeldin A (Sigma-Aldrich). Para la detección de CD107a (H4A3), se añadieron secundariamente 2 µM de monensina (Golgi Stop, BD). Las células se recolectaron entonces y se tiñó el fenotipo con anticuerpos monoclonales para los marcadores de superficie CD3 (UCHT1, eBioscience) CD8 (3B5, Invitrogen) y CD4 (SK3). Para definir los fenotipos de memoria, las células T se tiñeron extracelularmente para CCR7 (n^o 150503, R&D), CD62L (DREG56, Beckman Coulter), CD45RA (2H4LDH11LDB9, Beckman Coulter) y CD127 (hIL-7R-M21). Para excluir las células muertas, se añadió un colorante de tinción de discriminación vivas/muertas (Invitrogen). Posteriormente, las células se permeabilizaron con solución Perm2 (BD Biosciences) y se tiñeron para IFN γ (4S.B3, eBiosciences), TNF α (MAb 11), IL2 (MQ1-17H12), CD137 (4B4-1) y CD154 (TRAP1). Para definir las células T reguladoras, se tiñeron las células T intranuclearmente para Foxp3 (259D/C7) y Helios (22F6, BioLegend). Para la tinción intracelular de Foxp3 y Helios, se utilizó el kit de tinción Foxp3 de eBioscience. Las células se midieron con un citómetro de flujo y se analizaron utilizando el software FlowJo Versión 8 (Tree Star). Los linfocitos se regularon basándose en el perfil FSC frente a SSC y posteriormente se regularon por GSC (altura) frente a FSC para excluir dobletes.

Análisis citométrico de flujo

A continuación de la estimulación específica de antígeno, se determinaron la secreción de citocinas (IFN γ , TNF α e IL-2) y la expresión de marcadores de activación (CD137 y CD154) por tinción fluorescente intracelular. Todos los anticuerpos se adquirieron en Becton Dickinson (BD), excepto donde se indica. Los monocitos infectados con virus y LCL o monocitos cargados con el agrupamiento peptídico (1 µg/ml IE-1/pp65) se añadieron a las células T con una relación de dilución de 1:10. Los LCL o monocitos no pulsados (incubados en DMSO) representan el control no estimulado. Para la detección de citocinas efectoras, las células T cultivadas se re-estimularon durante 18 h en presencia de 1 µg/ml de brefeldin A (Sigma-Aldrich). Para la detección de CD107a (H4A3), se añadieron secundariamente 2 µM de monensina (Gogi Stop, BD). Las células se recolectaron entonces y se tiñó el fenotipo con anticuerpos monoclonales para los marcadores de superficie CD3 (UCHT1, eBioscience) CD8 (3B5, Invitrogen) y CD4 (SK3). Para definir los fenotipos de memoria, las células T se tiñeron extracelularmente para CCR7 (n^o 150503, R&D), CD62L (DREG56, Beckman Coulter), CD45RA (2H4LDH11LDB9, Beckman Coulter) y CD127 (hIL-7R-M21). Para excluir las células muertas, se añadió un colorante de tinción de discriminación vivas/muertas (Invitrogen). Posteriormente, las células se permeabilizaron con solución Perm2 (BD Biosciences) y se tiñeron para IFN γ (4S.B3, eBiosciences), TNF α (M Ab11), IL2 (MQ1-17H12), CD137 (4B4-1) y CD154 (TRAP1). Pardefinir las células T reguladoras, se tiñeron las células T intranuclearmente para Foxp3 (259D/C7) y Helios (22F6, BioLegend). Para la tinción intracelular de Foxp3 y Helios, se utilizó el kit de tinción Foxp3 de eBioscience. Las células se midieron con un citómetro de flujo y se analizaron utilizando el software FlowJo Versión 8 (Tree Star). Los linfocitos se regularon basándose en el perfil FSC frente a SSC y posteriormente se regularon por GSC (altura) frente a FSC para excluir dobletes.

65

Otros antígenos o epítomos a los que es aplicable la presente invención incluyen, a modo de ejemplo no limitante, los antígenos del virus de Epstein Barr (EBV), papilomavirus humano (HPV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), o antígenos asociados a tumores tales como WT1, PAX2/8, Tirosinasa, y/o MAGE.

- 5 Por lo tanto, la presente invención no se limitará a células T específicas del CMV sino que más bien se dirige hacia un método general de provisión de preparaciones celulares específicas de un agente patógeno para su uso en medicina.

Breve descripción de las figuras

- 10 La Fig. 1 muestra la expresión de CD4+ y CD8+ (A) y la proporción de células T de memoria central con CD4+ (panel de la izquierda) y CD8+ (panel de la derecha) (B) de células T específicas de antígeno de CMV después de 18 días de expansión en presencia de rapamicina (VLD = 2 nM, LD = 20 nM; Sirolimus (rapamicina)).
- 15 La Fig. 2 muestra la expresión de CD4+ y CD8+ (A), y la proporción de células T de memoria central con CD4+ (panel de la izquierda) y CD8+ (panel de la derecha) (B) de células T específicas de antígeno de CMV después de 18 días de expansión en presencia de aIL2R (aIL2R = antagonista del receptor de IL-2).
- La Fig. 3 muestra la lisis de dianas específicas de células T específicas de CMV tratadas.
- 20 La Fig. 4 muestra una evaluación citométrica de la expresión de CD4+ y CD8+ en células T después de 18 d de expansión con el tratamiento indicado (A; VLD, LD = sirolimus (rapamicina); B, aIL2R = antagonista del receptor de la IL-2) y los factores de expansión de cultivo total (C) y TCM (D) después de 18 d de tratamiento.
- La Fig. 5 (A Sirolimus, B aIL2R) muestra la caracterización funcional de células T expandidas específicas de CMV el día 18 (A; VLD, LD = Sirolimus (rapamicina), B; aIL2R = antagonista del receptor de IL-2, unstim: controles sin estimular).
- 25 La Fig. 6 (A, B: sirolimus; C, D: aIL2R) muestra la caracterización fenotípica (A, C: panel de la izquierda; CD4+ CD62L+/ y panel a la derecha; expresión de CD8+ CD62L+ y B, D: expresión del marcador de activación; panel de la izquierda; CD4+ CD137+ CD154+ y panel de la derecha; CD8+ CD137+) de células T expandidas específicas de CMV el día 18. Todos los porcentajes se refieren al total (la suma de) las células CD4 y CD8.
- 30 La Fig. 7 Un cultivo de células T en masa (ambos, CD4+ y CD8+), CD4+ solo y CD8+ solo se cultivaron separadamente durante 18 días. (A) Histogramas que indican la cantidad de células T CD4+ en el espécimen respectivo. El análisis de células T CD8+ (panel superior) y células T CD8+ del cultivo en masa (panel inferior) se llevó a cabo sin adición adicional de células T CD4+ ni gradiente de suplementación de células CD4+ antes de la re-estimulación específica (la barra creciente denota el aumento de la cantidad de células T CD4+). (B) Secreción de citocinas IFN γ y TNF α y (C) La expresión de marcadores de activación CD137 y CD154 se determinó por tinción intracelular. Se muestra la funcionalidad de células T CD8+ (panel superior) y células T CD8+ en el cultivo en masa (panel inferior) modificado por gradiente de suplementación de células CD4+.
- 35 La Fig. 8 Modificación de la señalización del receptor de IL2 direccionando la unión del receptor IL-2 o la ruta mTOR hace posible una inmunidad protectora superior de células T CD8+ mediada por CD4. La Fig. muestra la capacidad de células T específicas de agrupamiento peptídico de CMV expandidas con sirolimus o antagonista del receptor IL-2 para responder de manera superior a monocitos autólogos infectados con NEWT. A continuación de la estimulación específica, la secreción de citocinas IFN γ y TNF α (panel superior) y expresión de marcadores de activación CD137 y CD154 (panel inferior) se determinaron por tinción intracelular.
- 40 La Fig. 9 muestra las mediciones citométricas para evaluar las células T reguladoras con los marcadores específicos FoxP3 y Helios.
- 45 La Fig. 10 muestra un resumen de seis experimentos independientes que muestra las respuestas de células T específicas de antígeno (IFN γ +, TNF α +, IL2+) contra el agrupamiento peptídico CMVpp65/IE1 en LCL pulsadas. Se indica el tratamiento inhibitor respectivo. Las frecuencias se evaluaron por citometría de flujo.
- 50 La Fig. 11 muestra la respuesta de IFN γ de células T a continuación de la estimulación con péptidos de CMV *ex vivo* y las frecuencias y purezas del ensayo de captura de IFN γ por las células CD4+ y CD8+, respectivamente.
- 55 La Fig. 12 muestra una evaluación citométrica de la expresión de CD62L en células T CD4+ y células T CD8+. La célula T auxiliar CD4+ mejora la respuesta antivírica de la célula T CD8+. La señalización dirigida de IL-2 conserva la expresión de CD62L en células T CD4+ específicas de CMV. Las células T CD4+/CD8+ específicas de CMV se cultivaron por separado con rapamicina (LD) o aIL2Ra. En todos los gráficos, se muestra un representante de tres experimentos.
- 60 La Fig. 13 muestra la dependencia del factor de crecimiento de células T_{CM} generadas *in vitro*. Las células T específicas de CMV se generaron como se ha descrito. El resumen de cuatro experimentos independientes representa la diferenciación, proliferación, y función efectora de todas las permutaciones posibles de las variables: IL-2, IL-7, rapamicina (LD) y antagonista del IL-2R (aIL-2Ra).
- 65

La Fig. 14 muestra la secreción de IFN γ de los cultivos dirigidos con IL-2R en dependencia a la concentración de péptidos CMVpp65/IE1. Los cultivos dirigidos por la ruta del IL-2R presentaban un reconocimiento de células T aumentado. Las células T se re-estimularon durante 18 h con las LCL autólogas cargadas con el péptido a concentraciones de péptido decrecientes de 1, 0,1 o 0,01 mg/ml de pp65/IE-1 (la barra creciente denota concentraciones crecientes de péptido). La secreción de la citocina IFN γ se determinó por tinción intracelular. En todos los gráficos, se muestra un representante de tres experimentos.

La Fig. 15 muestra la secreción de IFN γ de células T CD8+ en el cultivo en masa o de células T CD8+ que se cultivaron solas. La función de células T CD8+ se puede inducir suplementando un número igual de células T CD4+ justo antes de la re-estimulación específica. Se muestra la secreción de IFN γ de células T CD8+ que se cultivaron solas. Las células T CD8+ se cultivaron por separado con rapamicina (LD) o aIL-2R α , según se indica.

Descripción detallada de las figuras

Como se muestra en la Fig. 1A, el método de la invención da lugar a una relación de células T CD4+/CD8+ más equilibrada después de 18 días de expansión sin afectar la expansión clónica. Se suplementaron con dosis baja (LD; 20 nmol/l) o dosis muy bajas (VLD; 2 nmol/l) de Sirolimus (rapamicina) cada 2 días de cultivo durante 14-18 días.

Como se muestra en la Fig. 1B, la diferenciación de fenotipo después de 18 días de expansión con Sirolimus aumentaba significativamente las células T de memoria/central. El fenotipo de memoria/central prologado se definía por la tinción de la proteína de superficie para CCR7 y CD45RA. Las células T de memoria/central se caracterizan por CCR7 - pero sin expresión de CD45RA. LD y VLD significan como anteriormente.

La Fig. 2 muestra el fenotipo de memoria/central en un espécimen tratado con aIL2R. De manera similar al tratamiento con el inhibidor de mTOR (rapamicina), la interferencia de IL2R da lugar a una relación de células T CD4+/CD8+ más equilibrada después de 18 días de expansión. Se suplementó el aIL2R (20 μ g/ml) cada 2 días de cultivo. Como se muestra en la Fig. 2B, la diferenciación del fenotipo después de 18 días de expansión con el antagonista de aIL2R aumenta significativamente las células T de memoria central. El fenotipo de memoria/central prologado se definió por la tinción de la proteína de superficie celular para CCR7 y CD45RA. Las células T de memoria/central se caracterizaban por CCR7- pero sin expresión de CD45RA. LD y VLD significa como anteriormente.

La Fig. 3 demuestra que las células T específicas de CMV tratadas no mostraban diferencias en la lisis de dianas específicas. La lisis de dianas se definía por el ensayo de vitalidad citométrica de flujo. Los datos demuestran que las células T específicas de CMV tratadas no muestran diferencias en la lisis de diana específica. La lisis de diana se definió por el ensayo de vitalidad citométrica de flujo.

La Fig. 4 muestra que la modificación de la señalización de IL2 por inhibición parcial mTOR/IL2R α da lugar a una proporción de CD4 aumentada en las células T seleccionadas por IFN gamma estimuladas por antígeno después de 18 d de expansión bajo el tratamiento indicado (Fig. 4 A; B). Las células se tiñeron con el colorante viva/muerta, CD3, CD4 y CD8. La Fig. C muestra el resumen de veces de expansión de células T CD4 y CD8 después del tratamiento indicado. Las veces de expansión se reducía, la expansión clónica del cultivo total no se afectaba significativamente. La Fig. D muestra que el tratamiento con rapamicina o el antagonista aIL2R da lugar a una expansión secuencial de ambas células T de memoria central CD4 y CD8.

La Fig. 5 muestra la evaluación citométrica de la secreción de citocina y la expresión del marcador de expresión de células T CD4+ y CD8+ (A Sirolimus; B antagonista de aIL2R). Se evaluaron las frecuencias a continuación de la estimulación específica por antígeno. Las células T específicas se estimularon durante 18 h (16 h con Brefeldin A) con APC cargadas de péptidos en una relación de 1:10. Las APC se pulsaron con 1 μ g/ml de agrupamiento peptídico IE1/pp65. La secreción de citocinas IFN γ , TNF α e IL2 y la expresión de marcadores de activación CD137 y CD154 se determinaron por tinción intracelular. Las células se permeabilizaron y se tiñeron para IFN γ , IL-2, TNF α , colorante vivas/muertas, CD3, CD4, CD8, CD137 y CD154.

La Fig. 6 muestra la evaluación citométrica del fenotipo de diferenciación de células T CD4+ y CD8+ después de 18 d de expansión y con el tratamiento indicado (A, B Sirolimus; C, D antagonista aIL2R). Las células se tiñeron para el colorante vivas/muertas, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD62L y CCR7. Las líneas de células T específicas de CMV tratadas con sirolimus o aIL2R presentaban una expresión significativamente prolongada del marcador de superficie CD62L. Las células T CD4+ y CD8+ específicas de CMV tratadas con sirolimus y aIL2R presentaban una expresión del marcador de activación CD137 dependiente de la dosis. Sin embargo, la expresión de los marcadores de activación CD137 y CD154 en células T CD4+ no estaba alterada después del tratamiento con sirolimus. El valor de p según el test de dos colas de rangos firmados de Wilcoxon, * = p < 0,05. Gráficos de caja con el intervalo de la mediana e intercuartil. Los datos se agruparon a partir de seis experimentos independientes.

La Fig. 7 muestra la respuesta CD8 antivírica con dependencia de la presencia de células CD4+ en la preparación. La Figura muestra la evaluación citométrica de la expresión del marcador de activación CD137 y la tinción de

citocinas intracelular en células T CD8+. Las frecuencias se evaluaron a continuación de la estimulación específica de antígeno. Las células T específicas se estimularon durante 18 h (16 h con Brefeldin A) con APC pulsadas con el agrupamiento peptídico CMVpp65/IE1 en una relación de 1:10. Las células T CD8+ y las células T CD4+ se estimularon en un co-cultivo durante 18 h a relaciones descendentes de células T CD8+/células T CD4+. Las células se permeabilizaron y tiñeron para la expresión de marcadores de activación CD137 y CD154 y citocinas (TNF α , IFN γ). Las células se tiñeron por colorante vivos/muertas, CD3, CD4, CD8, CD137 y CD154.

La Fig. 8 muestra la capacidad de células T específicas del agrupamiento peptídico de CMV expandidas con sirolimus o antagonista del receptor IL-2 para responder con superioridad a los monocitos autólogos infectados con NEWT. Las líneas de células T específicas se generaron según se ha descrito. Las dianas (monocitos) incubadas con la cepa clínica NEWT de CMV con bajo número de pasajes se utilizaron como APC. Las células diana y las células T se co-cultivaron durante 18 h con una relación célula T/diana de 10:1. Se determinaron la expresión de marcadores de activación CD137 y CD154 y la capacidad de secreción de citocinas por tinción intracelular. Después de 2 h se añadió Bref-A para la detección de citocinas. Las células se permeabilizaron y tiñeron para colorante vivos/muertas CD3, CD4, CD8, IFN γ , TNF α , CD137 y CD154. Los monocitos incubados con fibroblastos representan los controles no estimulados.

La Fig. 9 muestra la evaluación citométrica de los marcadores FoxP3 y Helios específicos de células T reguladoras. Las células T reguladoras naturales no se encuentran entre las células T CD4+ y CD8+ después de las 18 h de expansión y el tratamiento indicado.

Fig. 10. inhibición de mTOR o bloqueo con aIL2R durante la fase de expansión de célula T aumenta las respuestas polifuncionales de células T específicas de antígeno. Las células se estimularon durante 18 h (16 h con Brefeldin A) con LCL pulsadas con el agrupamiento peptídico CMVpp65/IE1 en una relación de 10:1. Las células se permeabilizaron y se tiñeron para IFN γ , TNF α , IL2, colorante vivos/muertas, CD3, CD4 y CD8. El resumen de seis experimentos independientes muestra respuestas de células T específicas de antígeno polifuncionales (IFN γ +, TNF α +, IL2+) contra LCL pulsadas con el agrupamiento peptídico de CMVpp65/IE1. Se calculó la significación estadística con el ensayo de pares coincidentes de Wilcoxon. * p < 0,05.

La Fig. 11 muestra la respuesta de célula T IFN γ a continuación de la estimulación con el péptido de CMV *ex vivo* y las frecuencias y purezas del ensayo de captura de IFN γ para células T CD4+ y CD8+, respectivamente. En comparación con las células T CD4+, las células T CD8+ producían cantidades sustancialmente mayores de IFN γ . De acuerdo con la expresión de CCR7 y CD54RA, las células T humanas de memoria pueden segregarse en células T intactas, células efectoras diferenciadas terminales (TEMRA), TCM y TEM. El ensayo de captura de IFN γ revelaba que las células T CD4+ representan predominantemente un fenotipo T intacto y TCM, sin embargo las células T CD8+ mostraban un fenotipo T intacto, TEM y TEMRA (Figura 11B). La gran proporción de células T intactas tanto en células T CD4+ como CD8+ se tiene que considerar como contaminación del ensayo. Como se muestra en la Figura 11B TEMRA así como TEM secretaban la mayoría de IFN γ .

Como se muestra en la Fig. 12, las células T CD4+ y CD8+ específicas de CMV aisladas se cultivaron por separado con rapamicina/antagonista IL-2R α . Los cultivos de células T CD8+ en masa incubadas con rapamicina-antagonista IL-2R α así como las células T CD4+ dirigidas a la ruta IL-2R presentaban un aumento de la expresión de CD62L. Por el contrario, la expresión de CD62L en células T CD8+ purificadas no podía aumentarse. Por lo tanto, la función efectora de células T CD8+ y el fenotipo de memoria en cultivos de células T específicas de antígeno se puede mejorar en presencia de células T CD4+.

Como se muestra en la Fig. 13, las células T expandidas con IL-2 sola presentaban una fuerte proliferación y buena capacidad de secreción de citocinas; sin embargo, la mayoría de las células T presentaban un fenotipo TEM diferenciado tardíamente. La IL-7 sola presentaba una proliferación de células T extraordinariamente reducida pero de alguna manera conservaba la expresión de CCR7/CD62L en comparación con la suplementación de IL-2 o IL-2/IL-7. La adicción de rapamicina/antagonista IL-2R α junto con IL-2 o IL-7 promueve la formación de TCM manteniendo la citotoxicidad. En presencia de rapamicina/mAb anti-CD25, la IL-2 sola era menos eficaz para conservar el fenotipo TCM pero mucho más potente en la expansión e inducción de la funcionalidad efectora en comparación con la IL-8 sola. Los mejores resultados con respecto a la tasa de expansión y el mantenimiento del fenotipo TCM con funcionalidad completa se veía después del cultivo con ambas IL-2 e IL-7, en presencia de rapamicina/antagonista IL-2R α .

Como se muestra en la Fig. 14, las células T se estimularon con concentraciones decrecientes de péptidos para definir el intervalo de reconocimiento de las células T. La respuesta de células T IFN γ caía proporcionalmente con la disminución de las concentraciones peptídicas. En comparación con las células T derivadas de los cultivos dirigidos a la ruta del IL-2R, las células T sin tratar presentaban una reducción más fuerte en la secreción de citocina IFN γ al disminuir las concentraciones de péptido. El modelo de infección viva necesita un reconocimiento eficaz de las células T ya que la presentación de epítomos está reducida en comparación con las células cargadas de péptido.

Para ensayar el impacto de la cantidad de células T CD4+ sobre la función de células CD8+ en este modelo de infección, las células T específicas de CMV a partir de PBMC se aislaron y se cultivaron en células T en masa,

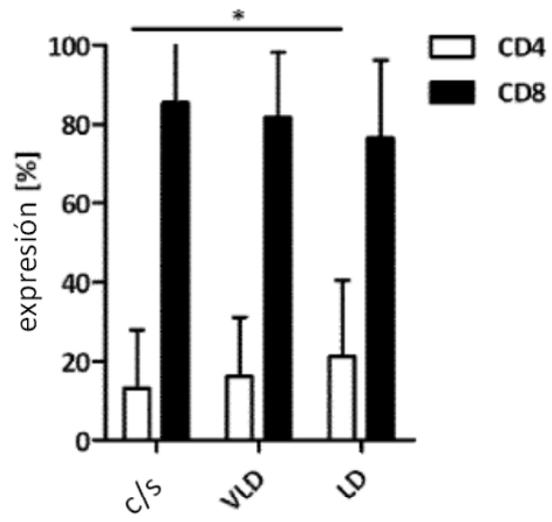
5 células T CD4+ y CD8+ clasificadas, como se muestra en la Fig. 15. A continuación de la re-estimulación específica con iDC infectadas con NEWT, las células T CD8+ cultivadas en masa mostraban marginalmente la secreción de citocina efectora IFN γ marginalmente, mientras que las células T CD8+ cultivadas en masa derivadas de cultivos dirigidos a la ruta del IL-2R revelaban una respuesta mucho más alta. Las células T CD8+ cultivadas sin células T CD4+ presentaban una secreción de citocina IFN γ casi abolida. Es de señalar que la funcionalidad de las células T CD8+, definida por la secreción de IFN γ , podría aumentarse suplementando un número igual de células T CD4+ justo antes de la re-estimulación específica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la generación de preparaciones de células T de memoria central CD4+ y CD8+ que son específicas para al menos un antígeno diana,
5 **caracterizado por que** dicho método comprende las etapas de:
- expandir células linfoides *in vitro* en presencia de un antígeno diana o fragmentos peptídicos del mismo en una etapa de expansión, que da lugar a una primera preparación de células T, en donde dichas células linfoides se aíslan de entre las células mononucleares de sangre periférica obtenidas de un paciente humano;
 - 10 • aislar las células que responden de la primera preparación de células T en una etapa de aislamiento, que da lugar a una segunda preparación de células T, en donde dichas células que responden secretan al menos interferón gamma a continuación del desafío;
 - cultivar, en una etapa de cultivo, las células obtenidas como segunda preparación de células T en presencia de interleucina 2 e interleucina 7, y un inhibidor del complejo mTOR 1 seleccionado de entre rapamicina y everolimus, en donde la concentración de dicho inhibidor del complejo mTOR 1 está entre 10 y 20 nmol/l.
 - 15
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de cultivo dura entre 10 y 25 días, entre 15 y 21 días o aproximadamente 18 días.
- 20 3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dichas células obtenidas como segunda preparación de células T se cultivan en presencia de 50 U/ml de interleucina 2 y 10 ng/ml de interleucina 7, y en el que la etapa de cultivo dura 18 días.

Fig. 1

A



B

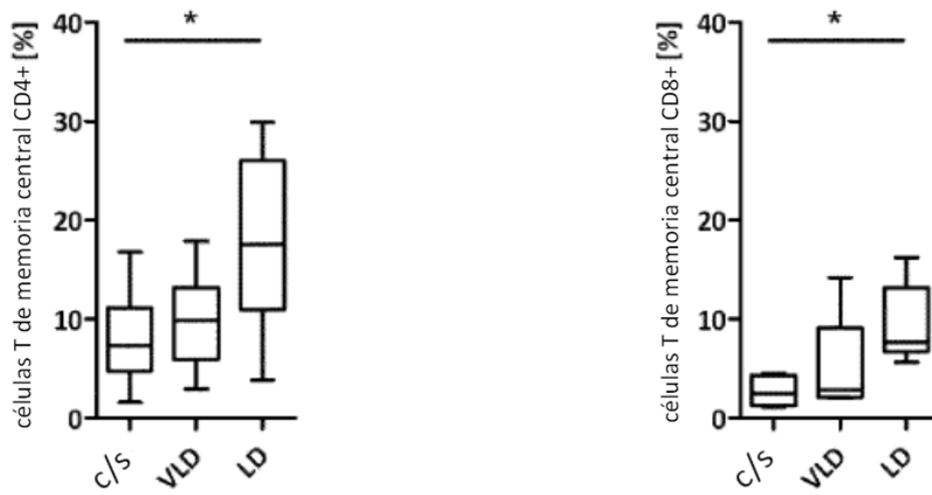
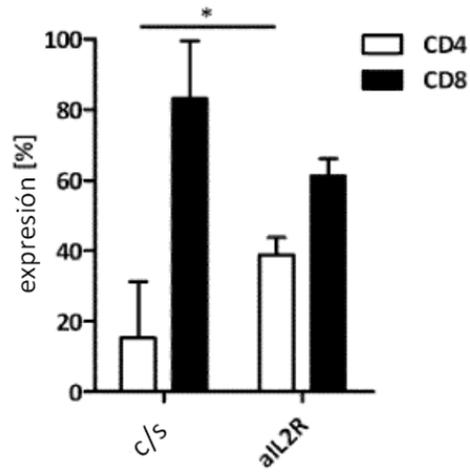


Fig. 2

A



B

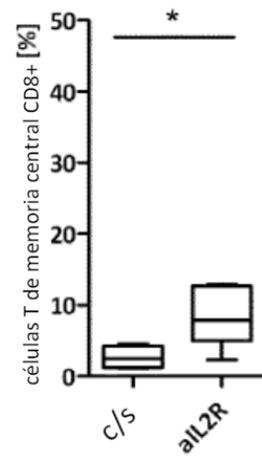
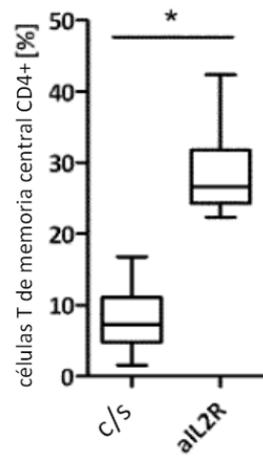


Fig. 3

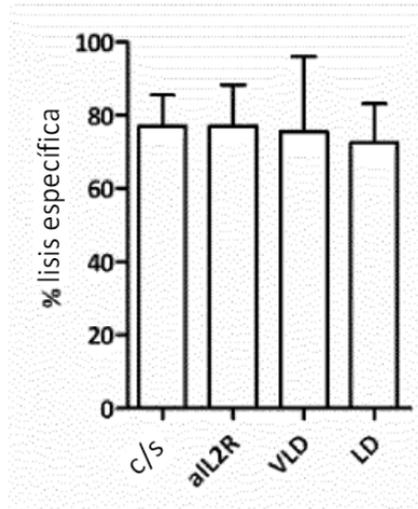


Fig. 4

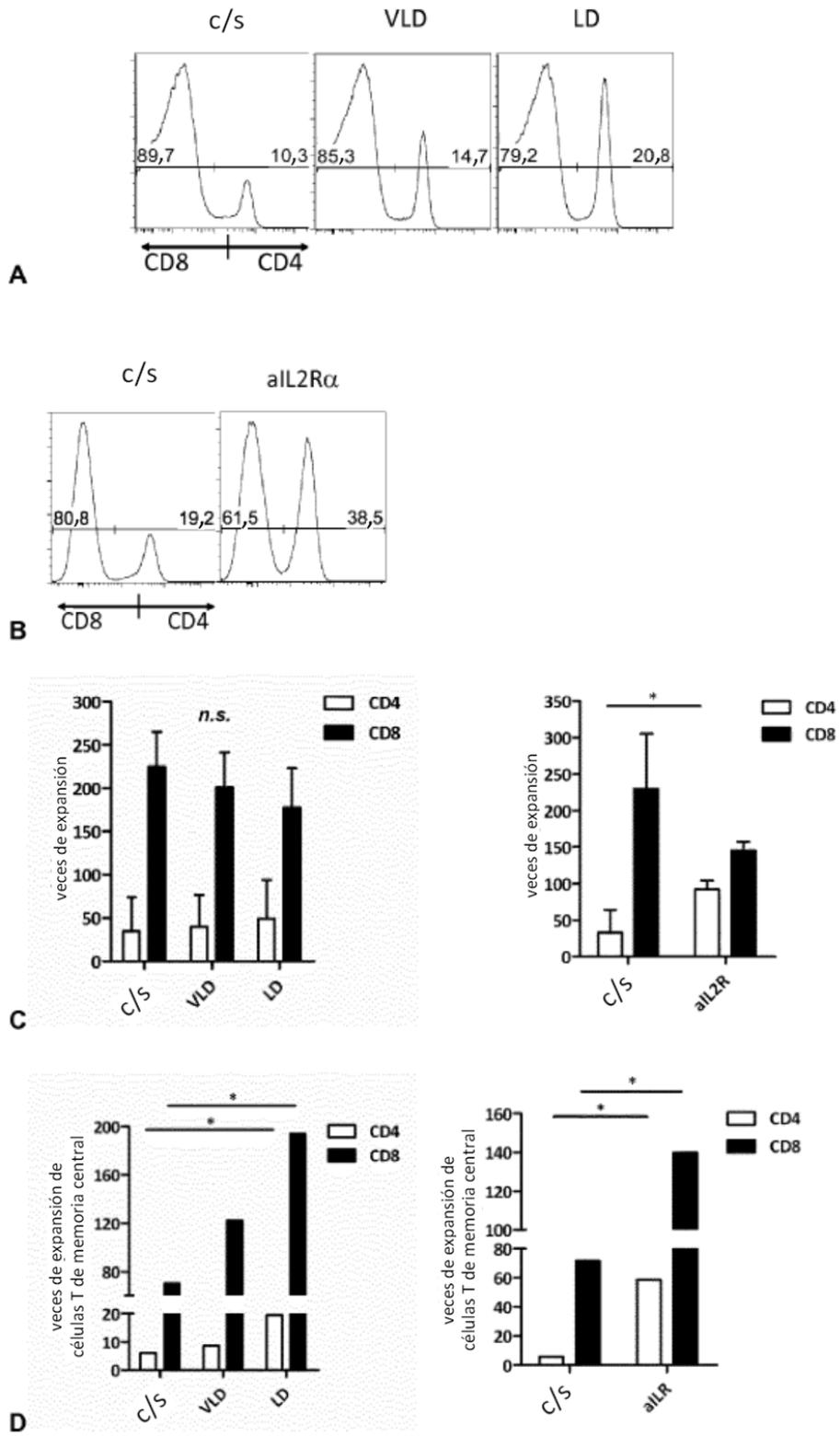
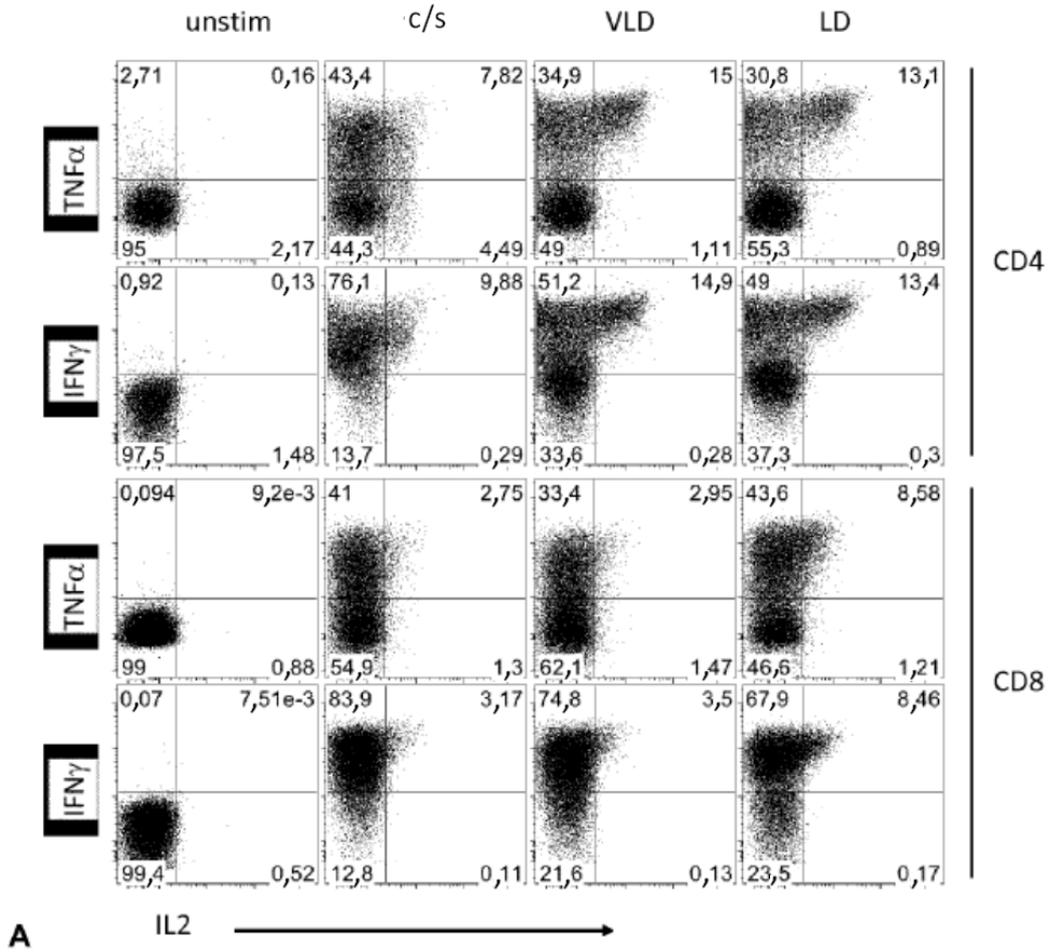


Fig. 5



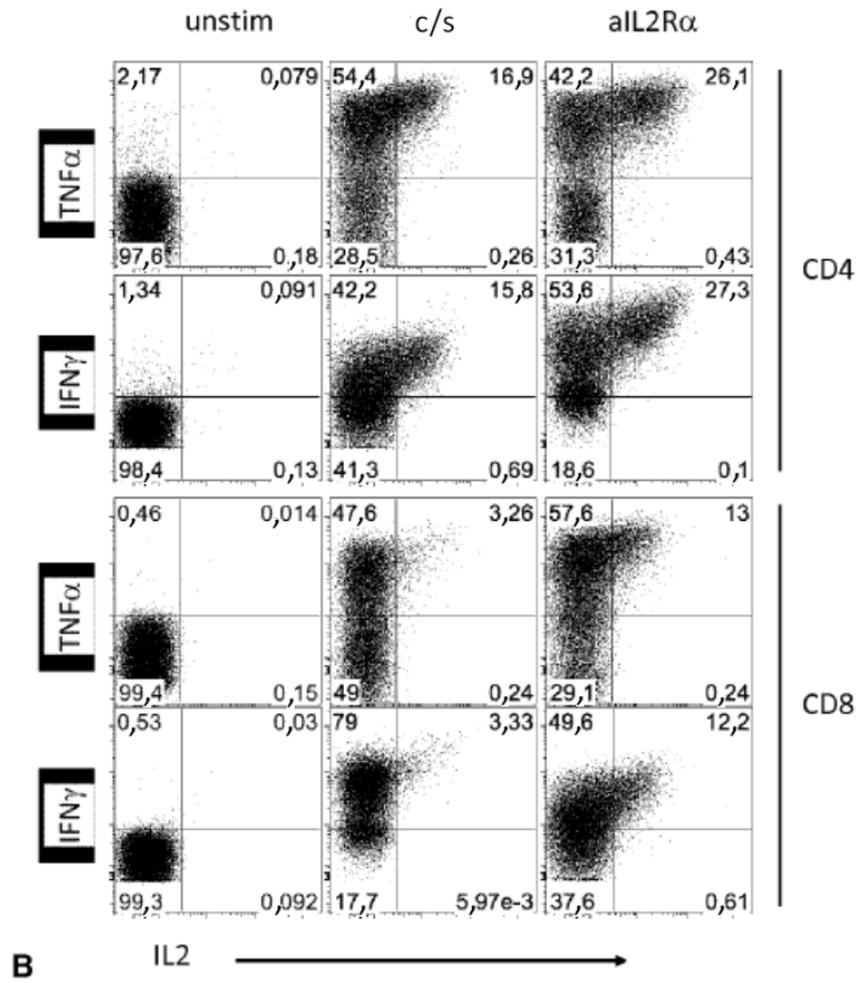


Fig.6

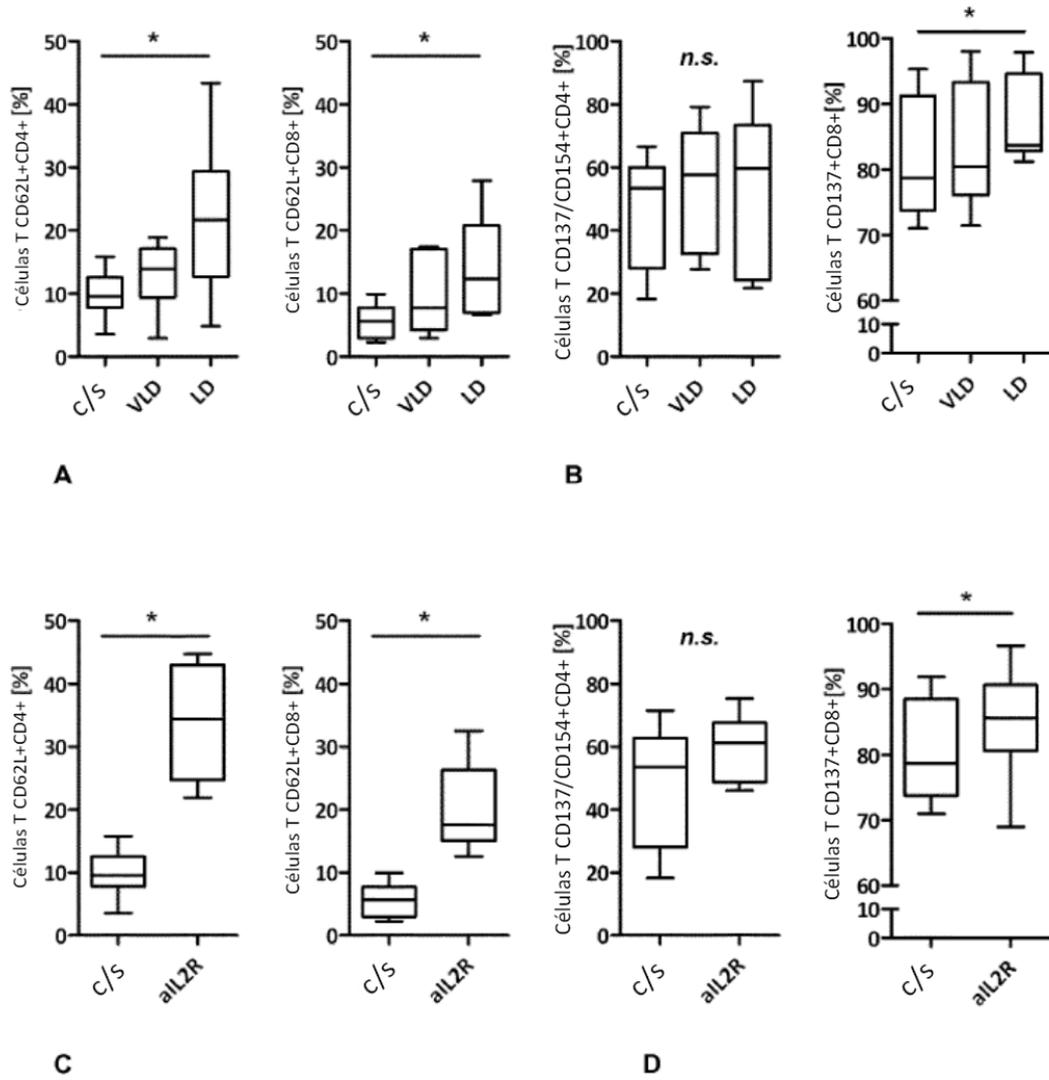
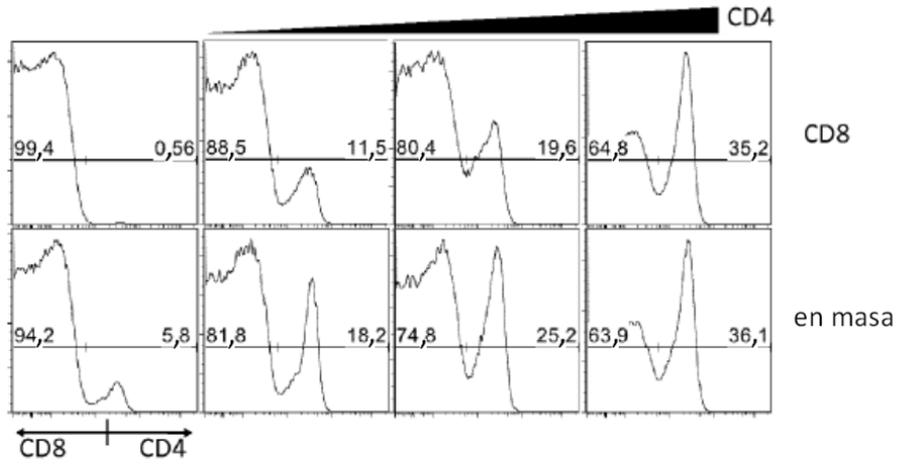
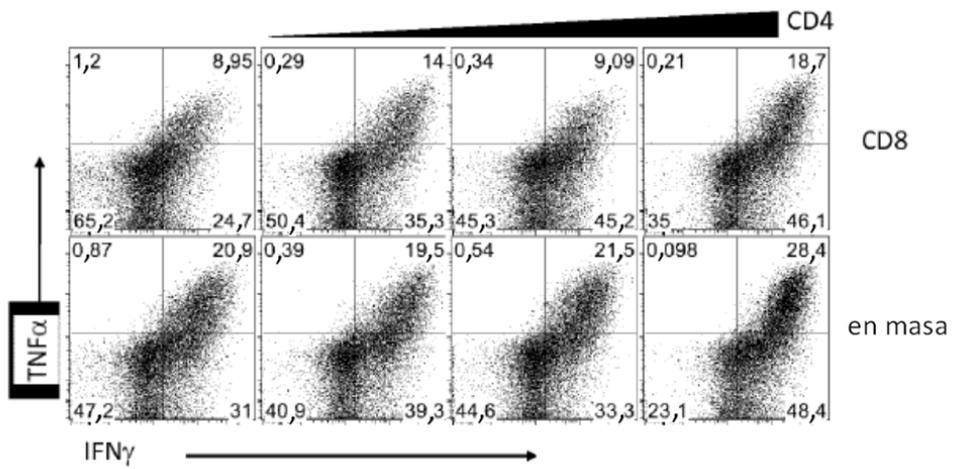


Fig. 7

A



B



C

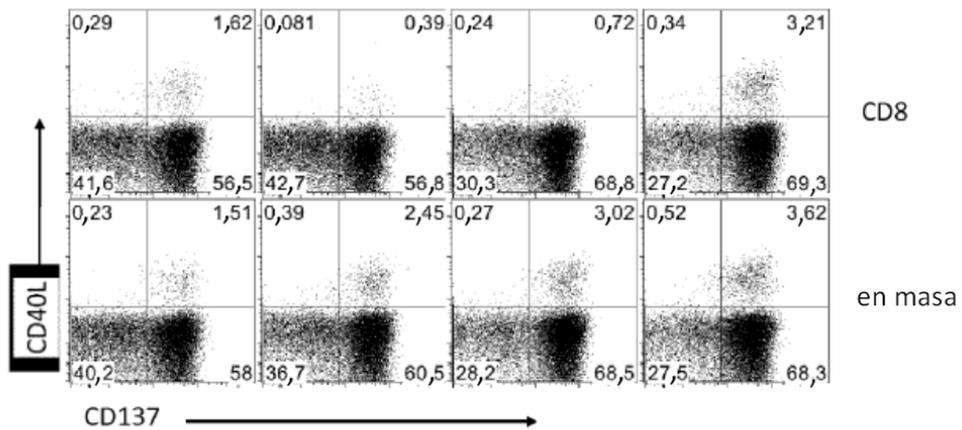


Fig. 8

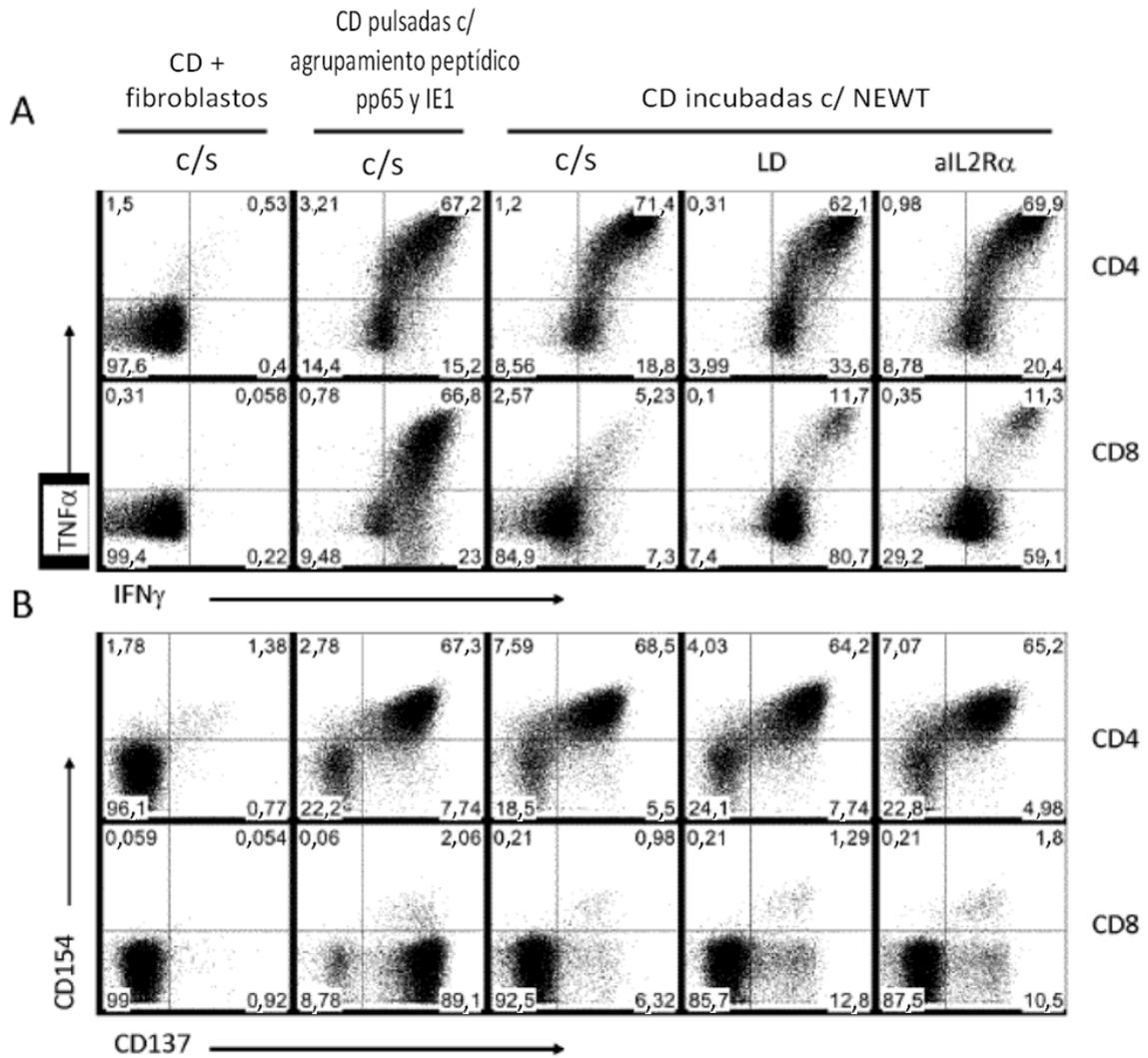


Fig. 9

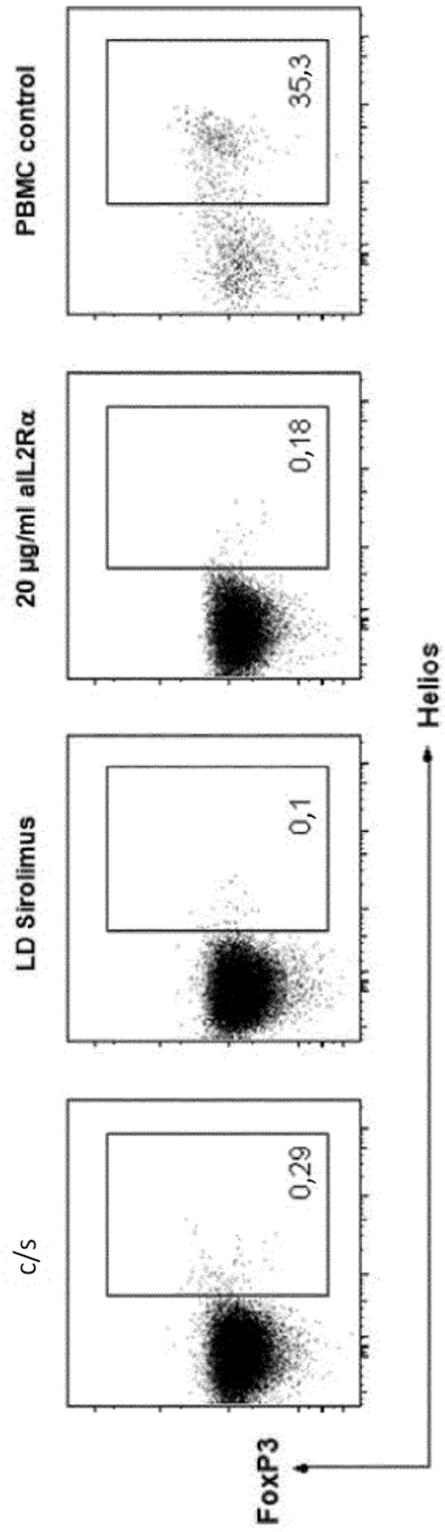
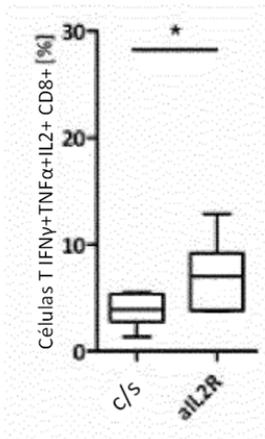


Fig. 10

A



B

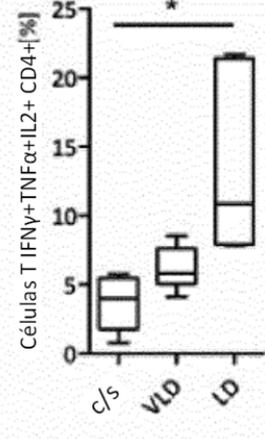
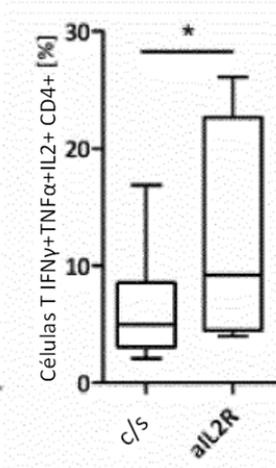
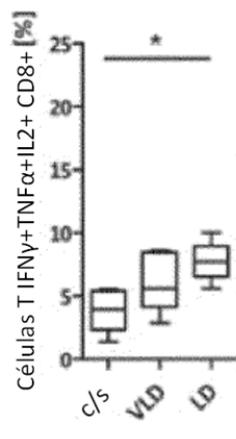


Fig. 11

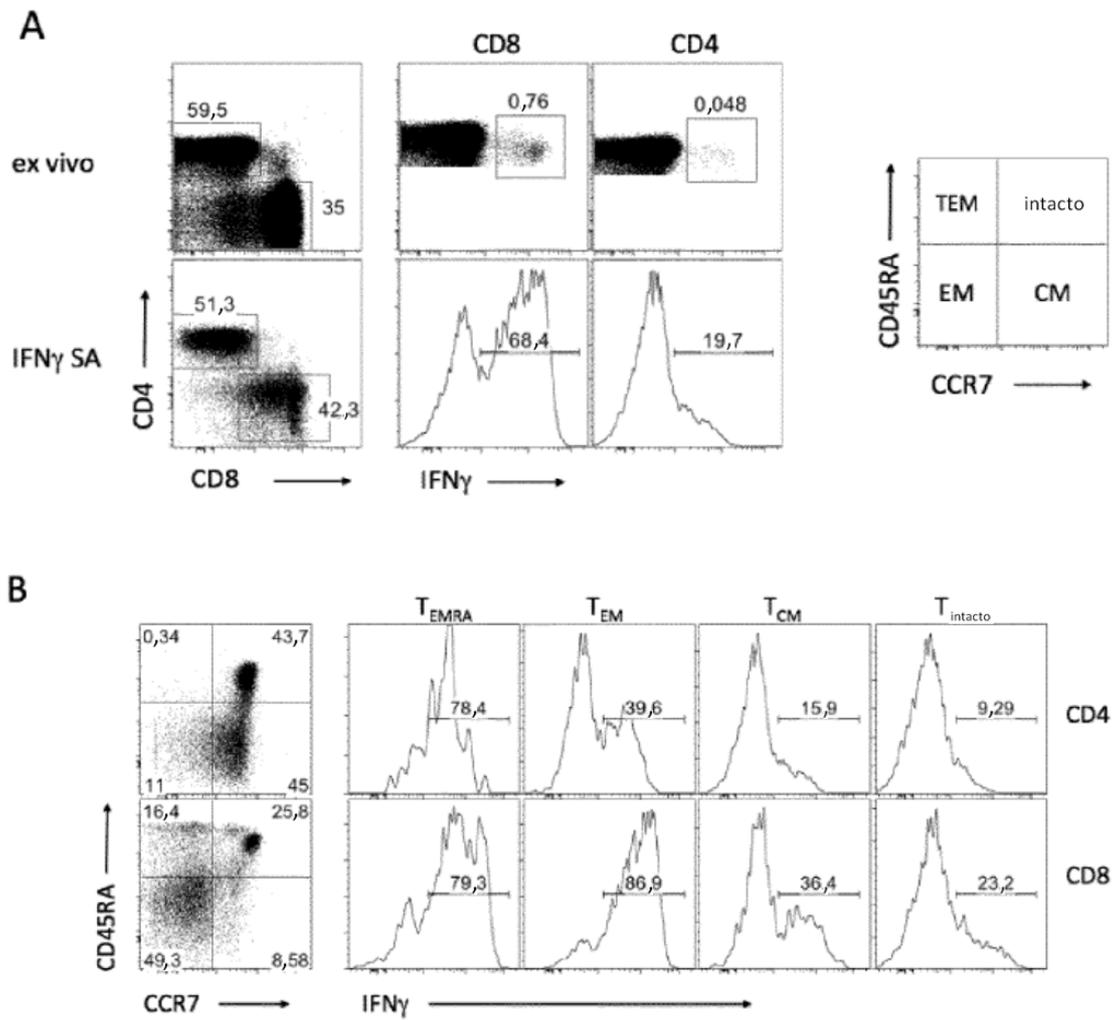


Fig. 12

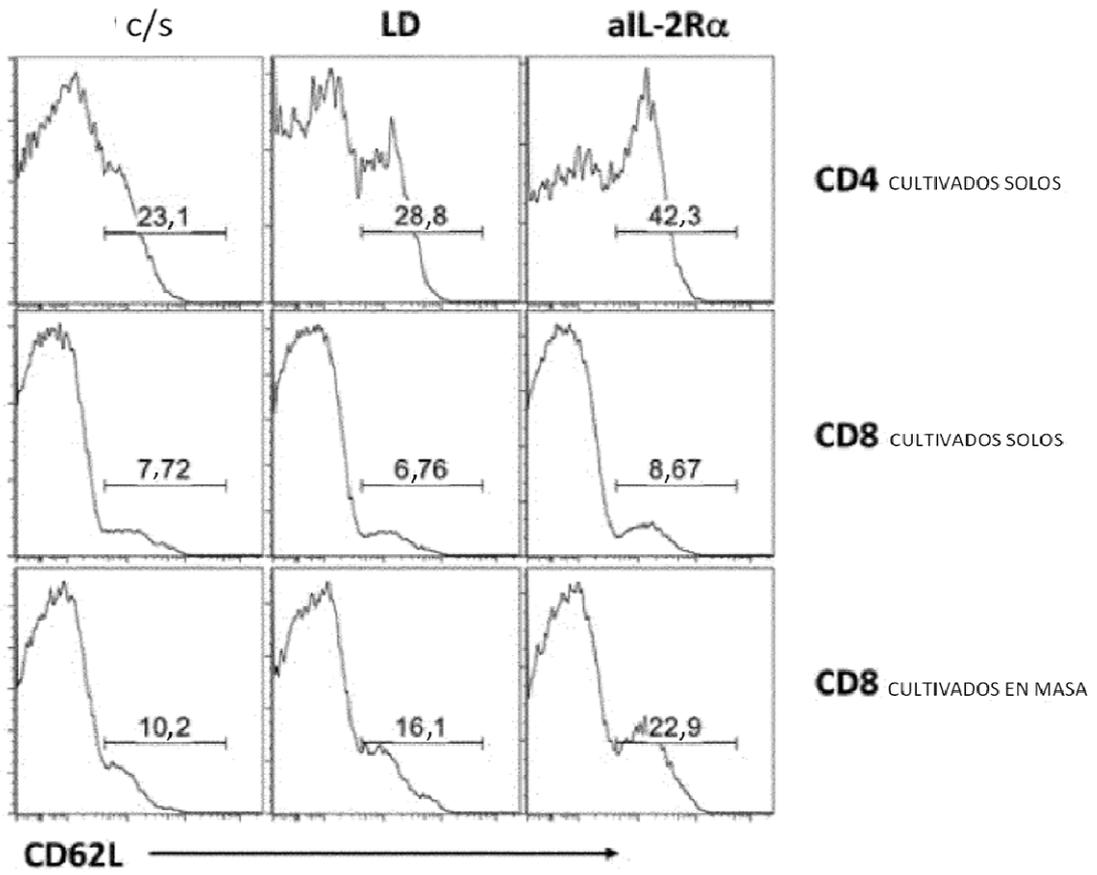


Fig. 13

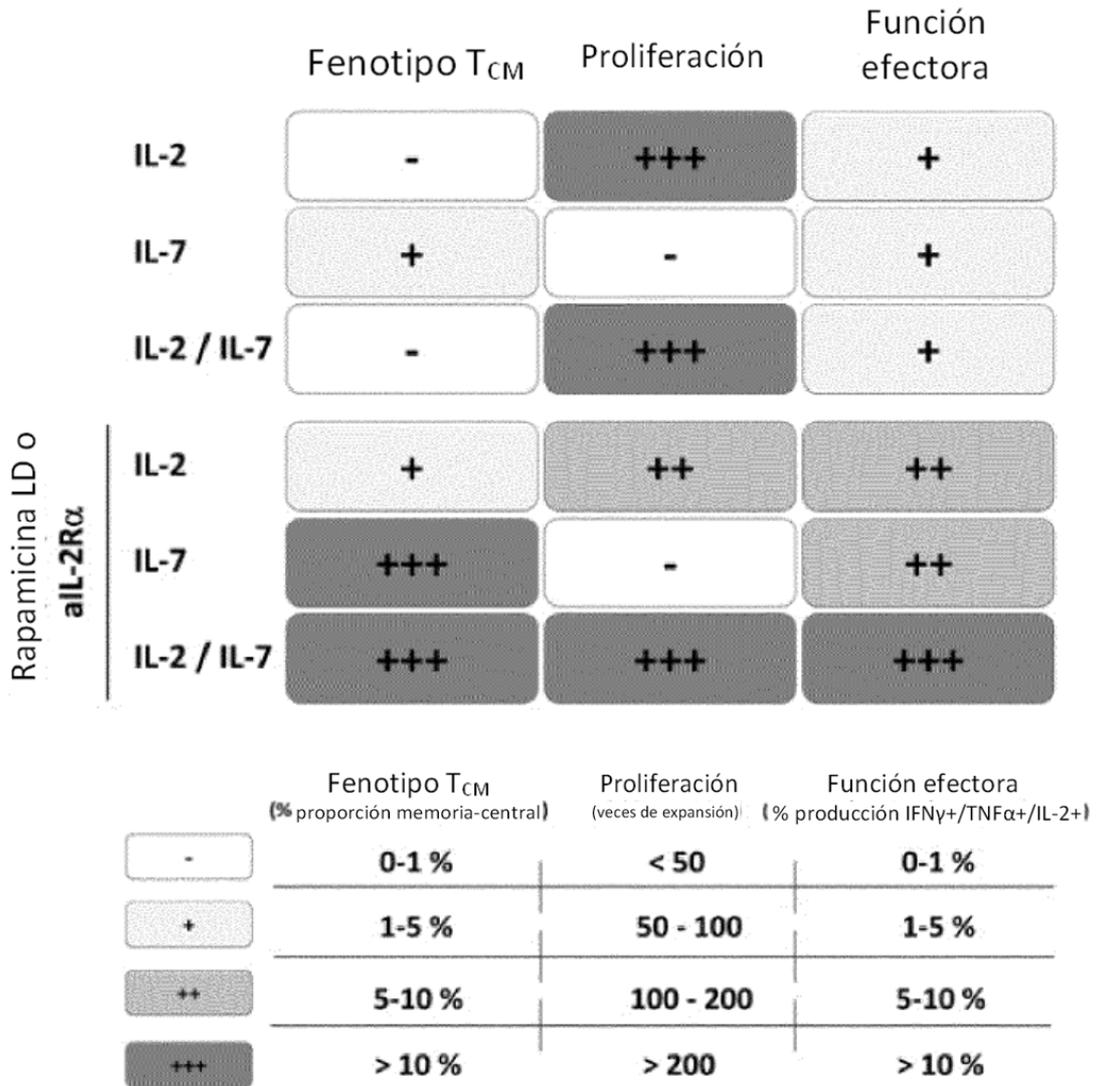


Fig. 14

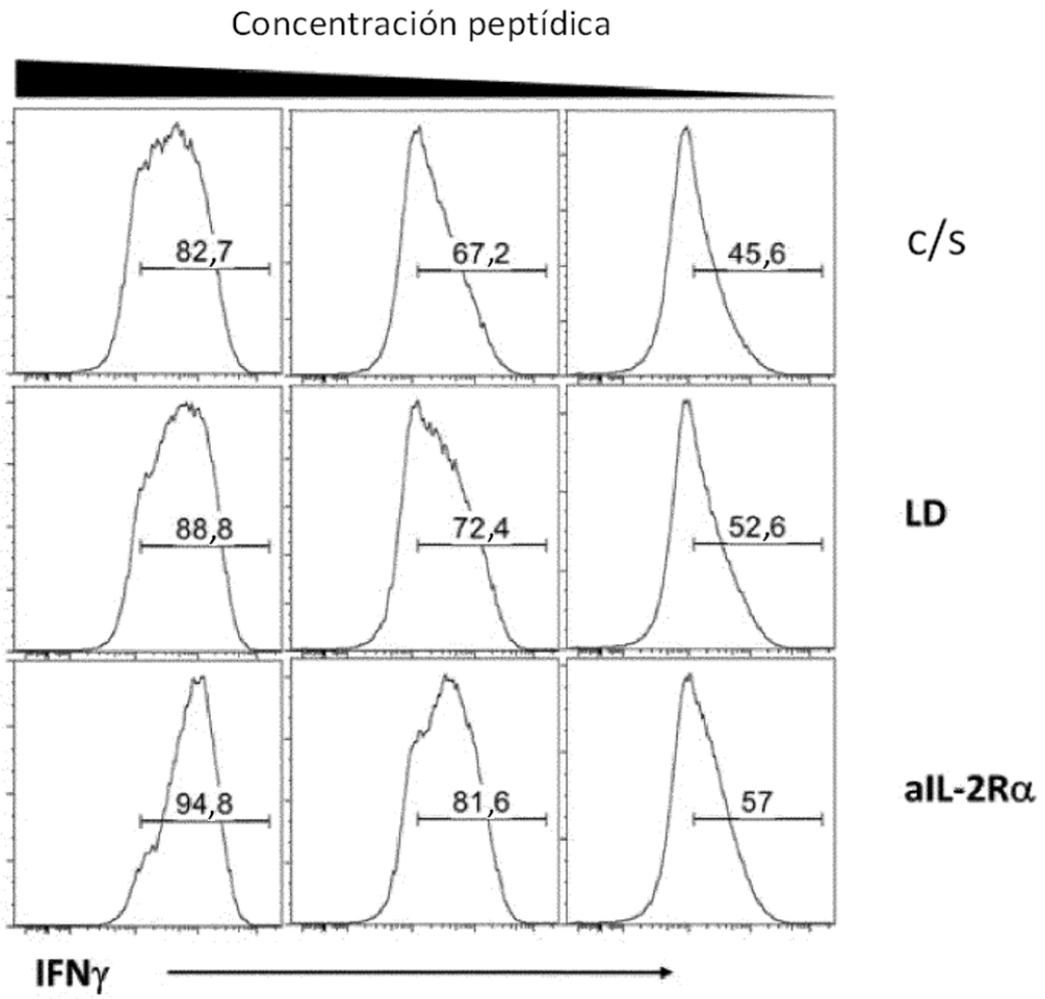


Fig. 15

