

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 577**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61K 35/17** (2015.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2011 PCT/US2011/048578**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12024666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2011 E 11818884 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2606125**

54 Título: **Células que expresan características y propiedades citotóxicas de Th1**

30 Prioridad:

**09.06.2011 US 201161495055 P**  
**20.08.2010 US 401881 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.03.2018**

73 Titular/es:

**IMMUNOVATIVE THERAPIES, LTD. (100.0%)**  
**Malcha Technology Park, 1 Agudat Sport Hapoel**  
**Street**  
**Jerusalem 96951, IL**

72 Inventor/es:

**HAR-NOY, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 660 577 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

Células que expresan características y propiedades citolíticas de Th1

## 5 ANTECEDENTES

La vacunación terapéutica del cáncer es un tipo de inmunoterapia. La inmunoterapia es una nueva modalidad de tratamiento que está emergiendo para unirse a la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía como una clase de fármacos para el tratamiento del cáncer. Los procedimientos de inmunoterapia buscan aprovechar el poder del sistema inmunitario a efectos de tratar enfermedades. La vacunación terapéutica es un tipo de inmunoterapia que es una terapia potencialmente curativa contra los tumores, virus y patógenos bacterianos existentes. Las vacunas terapéuticas consisten, en general, en una fuente de antígeno derivada de la enfermedad diana y un adyuvante diseñado para mejorar la respuesta inmunitaria deseada. En algunos protocolos de vacunas terapéuticas, las células inmunitarias vivas, ya sean derivadas del huésped (autólogas) o de un donante (alogénicas), son componentes de las vacunas terapéuticas. Las células inmunitarias vivas autólogas y alogénicas, tales como las células dendríticas, las células NK y las células T, también se utilizan en protocolos de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer.

Los linfocitos son parte del sistema inmunitario de los vertebrados e incluyen linfocitos granulares grandes y linfocitos pequeños. Entre los linfocitos granulares grandes se incluyen las células asesinas naturales (células NK). Los linfocitos pequeños consisten en células T y células B. Las células NK son parte del sistema inmunitario innato y juegan un papel importante en la defensa de un animal de tumores y células infectadas por virus. Las células NK pueden distinguir las células infectadas y tumorales de células no infectadas a través de las moléculas de superficie de complejo de multihistocompatibilidad (MHC) de clase I. Las células NK se activan en respuesta a citoquinas y tras la activación liberan gránulos citotóxicos, tales como perforina y granzima B, que destruyen las células infectadas o células tumorales. Las células NK están caracterizadas por los marcadores de superficie celular CD16+ y CD56+, pero no expresan CD4.

Las células T y las células B son parte de la respuesta inmunitaria adaptativa y reconocen antígenos no propios. Las células B responden al antígeno no propio mediante la producción de anticuerpos. Los diferentes tipos de células T responden a los antígenos no propios de diferentes maneras. Las células T citotóxicas (CTL) están caracterizadas por los marcadores CD3+, CD8+ y TCR $\alpha\beta$  y no expresan CD4. Las CTL CD8+ específicas de tumores son principalmente responsables de la eliminación del tumor. Además, las CTL pueden reconocer específicamente las células tumorales y no atacan a las células normales del mismo tejido. Las CTL producen gránulos tóxicos que contienen enzimas potentes, tales como granzima B y perforina, que inducen la muerte de células enfermas o cancerosas.

Las células T cooperadoras están caracterizadas por los marcadores de superficie celular CD3+, CD4+ y TCR $\alpha\beta$ . Las células T cooperadoras producen citoquinas u otras moléculas que dirigen la respuesta inmunitaria a través de otras células o moléculas. No se conoce que las células T cooperadoras medien directamente en la muerte de las células y, de este modo, normalmente no contienen gránulos citotóxicos, tales como granzima B o perforina. Las células T cooperadoras se subclasifican en dos tipos: T cooperadora de tipo 1 (Th1) y T cooperadoras de tipo 2 (Th2). Las células Th1 median en la inmunidad celular y son críticas para la erradicación de tumores mediada por el sistema inmunitario, mientras que las células Th2 median en la inmunidad humoral o por anticuerpos. Las células Th1 y Th2 son contrarreguladoras, el aumento de células Th1 regulan por disminución las células Th2 y viceversa.

Se han desarrollado un conjunto de procedimientos y composiciones de inmunoterapia a efectos de mejorar o suprimir la respuesta inmunitaria en pacientes. Los procedimientos de terapia celular a menudo implican manipulaciones *ex vivo*, tales como la proliferación, diferenciación y/o activación de las células y la transferencia de estas células a un paciente como terapia.

La inmunoterapia adoptiva implica eliminar los linfocitos del paciente, reforzar su actividad contra el cáncer *ex vivo*, cultivar las células en números elevados clínicamente relevantes y, a continuación, devolver las células al paciente,

Los experimentos iniciales en inmunoterapia adoptiva implicaron la extracción de linfocitos de la sangre de un paciente y el crecimiento de éstos en presencia de la linfoquina interleuquina-2 (IL-2), un estimulador del sistema inmunitario. A continuación, las células se devolvieron al paciente. Estos linfocitos se denominaron células asesinas activadas por linfoquinas (LAK).

Se obtuvo una respuesta más fuerte contra células tumorales utilizando linfocitos aislados del propio tumor. Estos linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se cultivan en presencia de IL-2 y se devuelven al cuerpo para atacar el tumor.

La inmunoterapia adoptiva es una forma de inmunoterapia, en la que las células procesadas *ex vivo* se introducen en el cuerpo. Los estudios preclínicos sugirieron que la actividad antitumoral se podría mejorar mediante la utilización de interleuquina-2 junto con linfocitos autólogos activados y expandidos *ex vivo*. Además, las primeras respuestas objetivas con terapia con bolos en altas dosis de interleuquina-2 se observaron en los pacientes que

recibieron interleuquina-2 junto con células LAK preparadas través de la activación *in vitro* de linfocitos autólogos de sangre periférica que se recogieron por linfoferesis, e inicialmente, parecía que la combinación de interleuquina-2/LAK era más activa que la interleuquina-2 sola. La IL-2 es una citoquina producida por células cooperadoras Th1. El interés en la utilización de inmunoterapia adoptiva disminuyó después de que los estudios clínicos no demostraron que la adición de células LAK o TIL activadas con IL-2 fuera más eficaz que la IL-2 sola.

Las células T CD4+ (Th) son cruciales para la activación y regulación de la mayoría de los aspectos de la defensa del huésped contra las infecciones y para la función adecuada de linfocitos CD8+ citotóxicos (CTL). Gran parte de la investigación en inmunología tumoral se ha centrado en células T específicas de tumor autólogas de origen natural que son predominantemente CD8+ y se pueden aislar de melanoma y algunos otros tumores. Estas células se pueden expandir *in vitro* y se pueden volver a perfundir. Este tipo de inmunoterapia adoptiva ha dado lugar a respuestas tumorales objetivas y supervivencia a largo plazo en algunos pacientes cuya enfermedad es refractaria a otras intervenciones. Si bien existe una amplia experiencia clínica utilizando células T citotóxicas CD8+ como inmunoterapia adoptiva, las malas respuestas clínicas ponen de relieve la necesidad de mejorar estas terapias a efectos de lograr el rechazo del tumor en un porcentaje más elevado de pacientes.

Los linfocitos CD8+ pueden fallar en mantener la funcionalidad *in vivo*, en gran parte debido a la ausencia de la ayuda de células T CD4+. *In vitro*, las células CD8+ liberan grandes cantidades de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) después de la exposición a líneas celulares compatibles con MHC y lisan tumores autólogos positivos al antígeno y positivos al MHC de clase I. Sin embargo, la inestabilidad genética de las células tumorales con frecuencia conduce a pérdidas en la capacidad de procesar y presentar antígenos endógenos que dejan los tumores como dianas inherentemente poco fiables para las células T citolíticas CD8+. Además, las células T CD8+ parecen carecer de la capacidad intrínseca para orquestar una amplia respuesta antitumoral que parece inherente en algunos subconjuntos de células T CD4+.

Aunque las inmunoterapias con transferencia adoptiva de CTL han demostrado ser prometedoras en muchos modelos animales, la traducción de estos resultados a los seres humanos ha demostrado ser difícil y inalcanzable. Las células CD4+, especialmente del subtipo Th1, serían una adición atractiva al arsenal de la inmunoterapia disponible para proporcionar una "ayuda" natural a células CD8+ asesinas transferidas de forma adoptiva. Sin embargo, existen barreras importantes en el trabajo con células CD4+ específicas de tumor de origen natural. La diversidad genética del HLA de clase II asociado con células cooperadoras CD4+ en cualquier población determinada de pacientes es mucho más compleja que en el caso del HLA de clase I que se encuentra en células T citolíticas (asesinas) CD8+, haciendo que la identificación de epítomos y TCR sean más problemáticos. Además, las células T CD4+ se expanden *in vitro* no tan bien como las células CD8+ y las condiciones de cultivo afectan de manera significativa a sus características. Finalmente, existe una escasez de modelos animales realistas basados en células CD4+ específicas de tumor. Estos factores han limitado la investigación traslacional utilizando células T CD4+ y han limitado su uso clínico.

En el presente documento se da a conocer un procedimiento para producir cantidades clínicamente relevantes de células CD4+ que también contienen gránulos citolíticos de granzima B y perforina y funcionan como células Th1 (producen IFN-gamma y no IL-4) y tienen actividad de tipo NK (reconocen y destruyen células tumorales y no células normales) para utilizar en una vacuna terapéutica contra el cáncer y protocolos de terapia adoptiva de células inmunitarias.

#### 45 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Las vacunas terapéuticas contra el cáncer a base de células (inmunoterapia celular) son prometedoras como una estrategia nueva mínimamente tóxica para el tratamiento del cáncer. El efecto prometedor de esta estrategia se ha demostrado en modelos animales, pero ha sido difícil traducir este efecto prometedor a la clínica (Bodey, Bodey y otros, 2000). La aprobación reciente por la FDA del primer fármaco de inmunoterapia celular, Provenge® (sipuleucel-T), una inmunoterapia de células dendríticas autólogas para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico resistente a castrato asintomático o mínimamente sintomático (Kantoff, Higan y otros), ha renovado el entusiasmo para desarrollar productos de terapia celular mejorados para aplicación clínica.

Dado que se ha demostrado que es difícil traducir con éxito los mecanismos antitumorales mediados por el sistema inmunitario de las estrategias de inmunoterapia celular desarrolladas en los animales, los inventores de la presente invención se concentraron, en cambio, en la traducción de un mecanismo inmunitario antitumoral ya conocido para provocar efectos antitumorales clínicos significativos. Podría decirse que el mecanismo inmunitario antitumoral mediado por el sistema inmunitario más potente y más eficaz jamás descrito en los seres humanos es el efecto de injerto anti tumor (GVT) que se produce después del acondicionamiento no mieloablativo y el trasplante de células madre compatibles con HLA (Barrett y Childs 2000; Childs 2000; Resnick, Shapira y otros 2005). Desafortunadamente, estos efectos GVT suelen ir acompañados por la toxicidad de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) crónica. La GVHD crónica se asocia con una morbilidad significativa y es la principal causa de mortalidad tardía después del trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas (Lee, Klein y otros 2002), lo que limita significativamente la aplicación clínica del mecanismo de GVT.

La separación de los efectos beneficiosos del GVT de los efectos perjudiciales de la GVHD es difícil debido a que los efectos están relacionados entre sí y son proporcionales, ya que las manipulaciones que inhiben la GVHD también disminuyen el efecto del GVT (Li, Giver y otros 2009). Mediante el análisis de mecanismos mediados por el sistema inmunitario conocidos de los efectos del GVT y la GVHD interrelacionados, se planteó la hipótesis de que podría ser posible desarrollar una inmunoterapia celular alogénica que en lugar de separar los efectos de GVT/GVHD, mantendría la interrelación de los mecanismos inmunitarios mediante la inversión de la dirección de los efectos de injerto a huésped a de huésped a injerto (Har-Noy y Slavin 2008). La reversión satisfactoria de la dirección de los efectos daría lugar a un efecto de huésped contra tumor (HVT) acoplado a un efecto de rechazo no tóxico de huésped contra injerto (HVG).

Se planteó la hipótesis de que células Th1 alogénicas, activadas, desemparejadas intencionadamente que expresaban un alta densidad de CD40L y producían grandes cantidades de interferón (IFN)- $\gamma$  serían capaces de provocar efectos de HVT/HVG acoplados. Esta hipótesis se probó en un modelo animal de leucemia/linfoma de células B refractario de quimioterapia (Har-Noy, Zeira y otros 2008). Estos estudios demostraron que podría provocarse una actividad de HVT/HVG significativa por las células Th1 alogénicas diferenciadas *ex vivo* sólo cuando se activaran y se administraran las células Th1 unidas a microesferas recubiertas de anticuerpo anti CD3/anti CD28. Estudios adicionales indicaron que estas células Th1 alogénicas reticuladas con CD3/CD28 tenían ambos efectos inmunomoduladores, eran capaces de conmutar la inmunidad de Th2 dominante sistémica a la inmunidad de Th1 dominante; y tenían efectos adyuvantes para promover el desarrollo de la inmunidad específica de Th1 y la desregulación de los mecanismos de "evitamiento inmunitario" de los tumores (Har-Noy, Zeira y otros 2009). A la vista de estos datos, se investigó la versión humana de aloinjertos de Th1 por la posibilidad de traducir esta estrategia experimental a la clínica.

Existían problemas regulatorios y logísticos significativos asociados con la diferenciación *ex vivo* y la expansión de células Th1 alogénicas que era necesario superar a efectos de utilizar estas células para investigaciones clínicas humanas. Uno de dichos problemas fue que la versión de ratón de las células Th1 alogénicas requería la utilización de citoquinas exógenas, IL-2, IL-12 y mAb anti IL-4 para causar la diferenciación *ex vivo* de células Th1 de ratón. La presente invención da a conocer el desarrollo exitoso de un proceso que cumple las GMP para la producción de células Th1 alogénicas humanas sin la utilización de citoquinas exógenas dando lugar a una identidad consistente entre lotes y características funcionales de clasificación como fármaco biológico humano. Después de la caracterización de las células de aloinjertos resultantes, el proceso de producción humano dio lugar a un hallazgo inesperado. Las células Th1 alogénicas generadas mediante los procedimientos descritos en el presente documento no sólo desarrollaron características de Th1, sino que también desarrollaron características de tipo NK. Un aloinjerto con una combinación de Th1 y actividad de tipo NK es único y no se describe en la circulación sanguínea normal. Los procedimientos descritos en el presente documento implican el cultivo *ex vivo* de células T CD4+ purificadas, en reposo (CD25-), con fenotipo mixto de memoria y sin modificar (CD45RA y CD45RO, respectivamente). Las células se activan múltiples veces con mAb anti CD3/anti CD28 inmovilizados en ausencia de citoquinas exógenas. Las células se expanden 25-100 veces después de 9 días y se diferencian en células CD4+, CD45RO+, CD25+, células CD62<sup>hi</sup>. Esta célula intermedia se puede almacenar en nitrógeno líquido durante años. Cuando sea necesario para la administración al paciente, las células precursoras se incuban durante 4 horas con microesferas recubiertas con mAb anti CD3/CD28. Durante esta incubación final de 4 horas, las células precursoras se diferencian adicionalmente para disminuir la expresión de CD62L y aumentar la expresión de CD40L y CD25. Las células finales CD4+, CD45RO+, CD40L<sup>hi</sup>, CD62L<sup>lo</sup>, células CD25+ producen más de 1.000 pg/10<sup>6</sup> células de IFN- $\gamma$  y menos de 50 pg/10<sup>6</sup> células de IL-4 (fenotipo de Th1) y expresan gránulos citolíticos de granzima B y perforina y muestran actividad de tipo NK con la capacidad de lisar células tumorales y no células normales.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1A y la figura 1B son representaciones de la citometría de flujo a partir de la inmunotinción de antígeno de superficie de CD4 que demuestra el fenotipo celular antes y después de la selección de CD4+, respectivamente.

La figura 2A es una serie de representaciones de la citometría de flujo que demuestran el fenotipo de las células de origen que tienen como células en reposo CD4 sin modificar (CD4, CD45RA).

La figura 2B es una serie de representaciones de citometría de flujo que demuestran el cambio en el fenotipo después del cultivo en células de memoria CD4 activadas (CD4, CD45RO y CD25).

La figura 3 es una representación de la citometría de flujo que demuestra el desplazamiento en la expresión de CD62L de alto a bajo en CAC antes de la activación y CFB después de la activación.

Las figuras 4A-4C son representaciones del patrón de expresión de CD40L en células CD4+, CAC y CFB, demostrando respectivamente un aumento de la expresión de CD40L en CFB.

La figura 5 es un gráfico del ensayo de destrucción directa y muestra que CFB puede destruir las células de la línea celular tumoral, ARH77.

La figura 6A es una representación de la expresión de granzima B por CAC.

La figura 6B es una representación de la expresión de granzima B por CFB.

La figura 6C es un dibujo de una transferencia western que muestra la detección de perforina en CFB.

La figura 7 es un gráfico de la actividad de perforina-granzima B con y sin EGTA.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

La presente divulgación se refiere a composiciones que incluyen células con características únicas. La composición incluye células de un tipo celular que tiene propiedades tanto de células cooperadoras Th1 como de gránulos citolíticos y actividad de NK. Las células T CD4+ con la combinación de las características de Th1 y las características de NK pueden proporcionar capacidades terapéuticas considerables para pacientes que tienen una variedad de enfermedades. Las características de Th1 puede incluir, por ejemplo, la producción de IFN-gamma sin la producción de IL-4. Las características de NK pueden incluir la destrucción de células tumorales, pero no de células normales, utilizando la expresión de granzima B y perforina. En particular, la presente invención da a conocer una composición que comprende células Th1 CD4+/asesinas activadas que tienen características de Th1 y actividad citolítica directa contra una línea celular tumoral, tal como se define en la reivindicación 1 más adelante.

En el presente documento se dan a conocer procedimientos para provocar la diferenciación y la expansión de este nuevo tipo de células en cantidades clínicamente relevantes para inmunoterapia adoptiva. Los procedimientos para derivar las nuevas células pueden incluir el aislamiento de células T, específicamente células T CD4+ de la sangre periférica o de otras fuentes de células T. Estas células T CD4+ se pueden diferenciar y expandir según procedimientos descritos en el presente documento en cantidades clínicamente relevantes y pueden utilizarse para inmunoterapia. Sorprendentemente, las células T CD4+ preparadas según estos procedimientos pueden mostrar actividad citolítica similar a la actividad citolítica que se encuentra generalmente en células NK/CTL y también muestran características y actividad de Th1.

En general, las células T cooperadoras no muestran directamente la actividad citolítica, pero producen citoquinas y otros factores que provocan, a continuación, otras células, tales como células NK y CTL, para inactivar o destruir las células enfermas. Las células T CD4+ en las composiciones de la presente invención pueden destruir directamente las células enfermas, así como producir citoquinas para estimular otras células, tales como células NK, que, a continuación, llevan a cabo la actividad citolítica. La actividad citolítica de estas células T CD4+ está mediada a través de granzima B y perforina dando lugar a la destrucción del tumor o de las células infectadas.

La actividad citolítica, tal como se denomina en el presente documento, se refiere a la destrucción directa de las células efectoras de las células o líneas celulares tumorales diana, cuando interactúan con las células diana. La destrucción directa puede producirse por la presencia de sólo las células efectoras y las células diana y sin la presencia de cualquier otro tipo de células.

El nuevo tipo de células descrito en la presente invención se denominará en el presente documento como células Th1/asesinas. Las células Th1/asesinas pueden mostrar una combinación de características de Th1, destrucción de células tumorales y no células normales y la expresión de la actividad de NK por medio de un mecanismo de expresión de granzima B y perforina.

Una cantidad clínicamente relevante de células, tal como se denomina en el presente documento, se refiere a un número suficiente de células Th1/asesinas para provocar un efecto antitumoral, ya sea directa o indirectamente. El número de células Th1/asesinas administradas, en general, es, como mínimo, de  $1 \times 10^6$  células, de manera preferente, como mínimo,  $1 \times 10^7$  células y, de manera más preferente, como mínimo, aproximadamente,  $1 \times 10^8$  células en una dosis única. Las dosis con una mayor cantidad de células también están dentro del alcance de la presente invención. De manera preferente, se produce una cantidad suficiente de células a partir de un solo donante de sangre para producir suficientes dosis para múltiples pacientes. Las cantidades clínicamente relevantes incluyen células suficientes, como mínimo, para un paciente, de manera más preferente, para hasta 10 pacientes y, de la manera más preferente, para más de 100 pacientes.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar a un paciente que tiene una variedad de células enfermas. El paciente puede ser un animal, humano u otros mamíferos. Las células enfermas pueden ser células cancerosas o células de tejido infectado. Las células enfermas pueden estar infectadas con virus y/o patógenos bacterianos. Las composiciones se pueden administrar a pacientes con tumores sólidos, tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer pancreático y similares. Las composiciones también se pueden administrar a pacientes con neoplasias hematológicas (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, y linfomas no de Hodgkin) o enfermedades infecciosas virales (por ejemplo, hepatitis B o C, herpes, VIH) y otros trastornos.

La composición descrita en el presente documento es de células vivas. Por células vivas se entiende que más del 70% de las células son viables, tal como se determina mediante técnicas de ensayo adecuadas, tales como extrusión con azul de tripano, MTT o detección bioluminiscente de los niveles de ATP, de manera que las células son capaces de manipulaciones *ex vivo*, tales como la expansión, diferenciación, y/o activación en condiciones apropiadas. Las composiciones, sin embargo, pueden incluir algunas células inactivadas, células radiadas y/o células no viables y componentes no vivos.

La composición incluye, en general, células CD4+ primero derivadas, por ejemplo, de sangre de un donante. El donante puede ser sin enfermedad o normal. Las células CD4+ se pueden procesar de la manera descrita en el

presente documento y, a continuación, formularse para la perfusión en el mismo donante o en un receptor relacionado o no relacionado.

Las células de origen CD4+ se purifican, de manera preferente, a partir de la sangre periférica. Las células CD4 pueden purificarse de varias maneras. En general, las células CD4+ se purifican a partir de la capa leucocitaria de sangre periférica mediante selección positiva. La selección positiva de las células CD4+ a partir de la capa leucocitaria se puede realizar, por ejemplo, mediante la utilización de esferas magnéticas y columnas obtenidas de Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Esto puede dar lugar a una composición celular que es mayor que aproximadamente el 90 por ciento, de manera preferente, mayor que aproximadamente el 95 por ciento y, de manera más preferente, mayor que aproximadamente el 98 por ciento de células CD4+ puras.

Las células CD4+ aisladas de la capa leucocitaria y utilizadas como material fuente para la producción de células Th1/asesinas se pueden caracterizar por la expresión de un conjunto de marcadores de la superficie celular. La población de células CD4+ purificadas a partir de la capa leucocitaria de la sangre periférica puede tener una población mixta de marcadores CD45RA/CD45RO. Las células T CD4+ son, en general, predominantemente CD25-. De manera preferente, la fuente de células CD4+ son en su mayoría sin modificar (expresan CD45RA y no expresan CD45RO). Las células T CD4+ de origen también pueden ser evaluadas para la expresión de CD62L y la expresión de CD40L. En general, las células T CD4+ de origen expresan cantidades muy bajas de CD40L. La expresión de CD62L puede ser un pico de intensidad de fluorescencia promedio (MFI) bimodal (alto y bajo). Las células CD4+ de origen tienen, de manera preferente, una expresión elevada de CD62L.

Las células T CD4+ de origen se pueden procesar para diferenciarse en células Th1/asesinas mediante múltiples etapas de activación. De manera preferente, las células CD4+ se activan cada tres días durante 9 días. Estas células CD4+ se activan a través de la reticulación de moléculas de la superficie celular CD3 y CD28. La reticulación de CD3 y CD28 se puede lograr mediante la adición de anticuerpos monoclonales inmovilizados anti CD3 y anti CD28. En general, las células Th1/asesinas se obtienen mediante la diferenciación y la expansión en cultivos celulares. Las células CD4+ activadas multiplicadas se pueden recoger del cultivo celular y se almacenan congeladas en nitrógeno líquido. Antes de la administración a un paciente, las células se activan por última vez. El agente de activación se deja asociado con las células. Las células con el agente de activación unido se formulan en un dispositivo, tal como una jeringa, adecuado para la perfusión o inyección. "Activación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la unión de las moléculas de la superficie celular por agentes, tales como anticuerpos monoclonales, y a la reticulación de estos agentes mediante agentes de reticulación. Este tipo de activación se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 7.435.592 y la Patente de Estados Unidos No. 7.402.431.

Las células T CD4+ se pueden activar de varias maneras, incluyendo mediante la utilización de anticuerpos monoclonales inmovilizados específicos para moléculas de la superficie de células T. Células T activadas adecuadas se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 7.435.592. Las células tienen, de manera preferente, restos de la superficie celular que son unidos por anticuerpos monoclonales u otros agentes de unión que, a continuación, se reticulan. Estos anticuerpos monoclonales y/o agentes de unión son reticulados, de manera preferente, por un agente, por ejemplo, inmovilizado sobre una superficie sólida a efectos de activar las células T. Éstas se denominan en el presente documento como células activadas en cultivo (CAC). Estas CAC preparadas *ex vivo* se pueden congelar para su utilización futura o se formulan para perfusión. Las CAC, por ejemplo, se pueden poner en alícuotas y congelarse en la fase gaseosa de tanques de nitrógeno líquido. Las CAC son capaces de cumplir de forma consistente con los criterios de identidad y de liberación funcional predefinidos, tal como se describen a continuación. En el proceso y al final, se establecen pruebas de control de calidad para asegurar la esterilidad y el estado libre de endotoxinas.

En una realización de ejemplo, las células T CD4+ se cultivan durante 9 días en presencia de esferas CD3/CD28 ClinEx Vivo Dynal Beads obtenidas de Invitrogen, Carlsbad, CA. Las células se cultivan en matraces Life Cell (Baxter Scientific, Deerfield, IL) a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> y se vuelven a estimular con las esferas en los días 3 y 6 de cultivo. Después de 9 días en cultivo, las esferas pueden extraerse y las células pueden denominarse CAC. Otros procedimientos de cultivo de células para la activación también están dentro del alcance de la presente invención.

En realizaciones preferentes, las CAC preparadas *ex vivo* se almacenan congeladas hasta que se necesiten para la administración al paciente o para otras utilizaciones. Antes de la administración al paciente, las CAC se descongelan, si es necesario, se lavan y se reactivan en medios nutrientes mediante la reticulación de restos de unión a la superficie celular, tales como CD3 y CD28, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 7.402.431. Las CAC, junto con los agentes de activación y de reticulación, a continuación, se pueden lavar y transferir a un tampón no nutritivo, tal como un tampón de formulación. Las células reactivadas en tampón de formulación se denominan en el presente documento células en tampón de formulación (CFB). Las CFB también pueden denominarse en el presente documento como células Th1/asesinas. Las células CFB y Th1/asesinas se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

Las células Th1/asesinas se pueden empaquetar en una jeringa u otros recipientes adecuados y se pueden transferir a un sitio de punto de asistencia, si es necesario. Las células Th1/asesinas se pueden administrar, a

continuación, al paciente con fines terapéuticos. Las células Th1/asesinas se pueden administrar por vía intravenosa, intraperitoneal, intradérmica o por otros procedimientos adecuados. Las células Th1/asesinas, una vez transferidas a un tampón no nutritivo, tienen una vida útil limitada. Las células se pueden formular a una densidad, como mínimo, de aproximadamente  $10^6$  células por ml, de manera preferente, de aproximadamente  $10^7$  células por ml o superior. En algunas realizaciones, las células se pueden formular en una densidad de aproximadamente  $10^8$  células por ml o superior. La concentración específica de las células se puede determinar mediante la utilización específica de las células y el protocolo de terapia.

La composición puede incluir también un conjunto de otros componentes, además de las células Th1/asesinas. Entre estos componentes se pueden incluir, por ejemplo, agentes que mantienen las células en el estado de activación deseado. En una realización de ejemplo, la composición puede incluir agentes que mantienen las células T en un estado activado, tales como Dynabeads ClinExVivo<sup>®</sup>, descritos, a continuación, en los ejemplos.

En general, las células se transfieren a un tampón no nutritivo que es apropiado para la perfusión en un paciente. Las células pueden estar en varios tampones no nutritivos. Un tampón no nutritivo, tal como se denomina en el presente documento, es cualquier tipo de medio, tampón u otro líquido que carece de los componentes apropiados para apoyar la proliferación y/o expansión celular. Los tampones no nutritivos, en general, son isotónicos, estériles USP, libres de pirógenos y contienen los componentes y/o el sistema de tampón apropiados para mantener células vivas intactas y están autorizados para utilización parenteral humana. En una realización de ejemplo, el tampón no nutritivo es un tampón de formulación que es Plasmalyte A (Baxter Scientific, Deerfield, IL) con albúmina de suero humano al 1%. (McKesson, San Francisco, California)

En realizaciones con células Th1/asesinas, las señales de activación para las células se mantienen incluso cuando las células se transfieren al tampón no nutritivo. Por ejemplo, en realizaciones en las que las células se activan mediante reticulación de los restos de unión a la superficie celular, la reticulación se mantiene, de manera preferente, en el tampón no nutritivo. El mantenimiento de la reticulación durante el almacenamiento puede ser crítico para la restauración de las características funcionales de la composición después de extraerla del almacén.

Las células Th1/asesinas en la composición pueden mostrar una nueva combinación de características funcionales. Entre estas funciones se incluyen características de Th1 y funciones citolíticas que son similares a las funciones de NK. Las células Th1/asesinas producen, en general, IFN-gamma y presentan una producción de IL-4 disminuida sustancialmente o nula. De manera preferente, la producción de IL-4 está por debajo de  $50 \text{ pg}/10^6$  células y la producción de IFN-gamma es mayor que  $1.000 \text{ pg}/10^6$  células.

Entre las características funcionales adicionales de las células Th1/asesinas se pueden incluir, por ejemplo, la expresión de moléculas funcionales, tales como CD40L, FasL, perforina y granzima B, moléculas coestimuladoras 4-1BBL, CD28, CTLA4, y citoquina inducida por activación relacionada con TNF (TRANCE), TWEAK, PD-1, familia B7, moléculas de adhesión, tales como las integrinas, las cadherinas, y las selectinas, y la secreción de una serie de citoquinas y quimioquinas y la expresión de receptores para estas citoquinas y quimioquinas. Las células Th1/asesinas pueden producir y secretar grandes cantidades de citoquinas. Las citoquinas producidas pueden ser, por ejemplo, IFN $\alpha$ , GM-CSF y TNF- $\alpha$ , con sólo una secreción residual de IL-4.

Las células Th1/asesinas descritas en el presente documento también pueden mostrar actividad citolítica. La actividad citolítica es similar a las características de las células CTL/NK. En general, la actividad citolítica de las células CTL/NK, así como las células Th1/asesinas, es específica para células tumorales o enfermas, pero no para las células normales. En otras palabras, las células Th1/asesinas pueden destruir las células enfermas, pero no las células normales. La actividad citolítica se puede producir a través de una serie de mecanismos. La actividad citolítica se puede producir, por ejemplo, a través del mecanismo de granzima B-perforina. La actividad citolítica puede conducir a la destrucción de las células por citolisis o apoptosis. La actividad citolítica de las células Th1/asesinas puede bloquearse por EGTA. La concentración de EGTA a aproximadamente 1 mM, por ejemplo, puede disminuir la actividad citolítica de las células Th1 activadas.

Las células Th1/asesinas de la presente invención expresan las moléculas de granzima B y perforina. La granzima B y la perforina, en general, no se expresan en células T CD4+, ya sea sin modificar o después de la maduración por diferenciación, activación y similares. La cantidad de granzima B y perforina en las células Th1 activadas puede variar. En general, la cantidad de granzima B y perforina expresadas es suficiente para destruir las células enfermas.

La presente invención incluye composiciones que incluyen células Th1/asesinas. Estas células Th1/asesinas pueden inactivar una serie de células tumorales, incluyendo las líneas de células tumorales de mieloma, tales como células ARH77. La inactivación de las células enfermas puede ser a través de un mecanismo sensible a EGTA. La proporción de células efectoras (células Th1/asesinas) con respecto a células dianas (células enfermas) puede variar. La proporción de células efectoras con respecto a células dianas puede ser, como mínimo, de 1:9, de manera preferente, como mínimo, de 1:5 y, de manera más preferente, como mínimo, de 1:1.

La composición de la presente invención se puede utilizar para destruir células enfermas. Las células enfermas pueden estar en un paciente. El paciente, por ejemplo, puede tener cáncer o contener tejido infectado debido a la

infección por un virus. El paciente puede tener un tumor sólido o una neoplasia hematológica. Esta utilización incluye administrar al paciente una composición que incluye las células Th1/asesinas descritas en el presente documento. Las células Th1/asesinas son, de manera preferente, alogénicas para el paciente. Las células alogénicas pueden ser de un donante alogénico normal. De manera alternativa, las células alogénicas pueden derivar de múltiples donantes y se combinan en una composición terapéutica. De manera preferente, se maximiza el desajuste en la histocompatibilidad entre el paciente y las células alogénicas. Se puede tolerar cierta histocompatibilidad entre el paciente y las células alogénicas y aún puede dar lugar al efecto deseado.

Las células Th1/asesinas se pueden administrar al paciente mediante una serie de vías, que incluyen la vía intradérmica, intravenosa, intraperitoneal y similares. Al paciente se le puede administrar una dosis o múltiples dosis. La cantidad de células administradas al paciente puede variar y puede depender de la enfermedad específica, del paciente, del procedimiento de activación y otros factores. En general, al paciente se le administra, como mínimo,  $10^7$  células Th1 activadas, de manera preferente, como mínimo,  $10^8$  y, de manera más preferente, como mínimo, aproximadamente  $10^9$  células.

La composición de la presente invención también se puede utilizar en el tratamiento de un paciente mediante la administración de una composición que incluye células Th1/asesinas. El paciente puede recibir una o más dosis de las células Th1/asesinas. La cantidad y la frecuencia de las dosis pueden variar y pueden depender de la enfermedad específica. En realizaciones preferentes, las células Th1/asesinas son alogénicas para el paciente y la administración de las células Th1/asesinas al paciente induce un efecto de huésped contra tumor junto con un efecto de huésped contra injerto sin enfermedad de injerto contra huésped.

## EJEMPLOS

**Materiales:** Las CD40L conjugadas a PE se adquirieron de Beckman Coulter, Brea, CA. La 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (1.000x) se adquirió de Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI. El Plasmalyte A se adquirió de Baxter Scientific, Deerfield, IL. La albúmina sérica humana (HSA) se adquirió de McKesson, San Francisco, California. El inhibidor de la unión a FcR se adquirió de eBioscience, San Diego, CA. Las esferas Dynabeads ClinExVivo® se adquirieron de Invitrogen, Carlsbad, CA.

**Preparación de células activadas en cultivo (CAC):** Se cultivaron células T CD4+ durante 9 días en presencia de esferas CD3/CD28 ClinEx Vivo Dynal Beads obtenidas de Invitrogen (localización). Las células se cultivaron en matraces Life Cell (Baxter) a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> y se volvieron a estimular con las esferas en los días 3 y 6 de cultivo. Después de 9 días en cultivo, las esferas pueden extraerse y estas células se denominan CAC.

**Preparación de las células en tampón de formulación (CFB):** Se colocaron células CAC en medio cRPMI para el lavado. Se registró el tiempo para indicar el comienzo del protocolo de formulación. Se centrifugaron las células en medio cRPMI, se extrajo el sobrenadante y las células se resuspendieron en tampón cRPMI. Se determinó la viabilidad celular utilizando ensayos con azul de tripano. Se utilizó el número total de células y la concentración de células vivas para determinar el porcentaje de células viables. Si la muestra tenía más del 80 por ciento de viabilidad celular, entonces el procedimiento continuó para la reactivación y la formulación de las células.

Las células CAC se resuspendieron a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml. La reactivación se realizó a una concentración de células vivas de  $1 \times 10^7$  células/ml. La reactivación se realizó en una placa de 24 pocillos, una placa de 6 pocillos o un matraz de 75 cm<sup>3</sup>, dependiendo del volumen. Se añadieron esferas Dynabeads ClinExVivo® CD3/CD28 para reactivar las células y se incubaron a 36-38°C y el 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas.

Después de la incubación durante aproximadamente 4 horas, a continuación, se extrajeron las células y se transfirieron a un tubo de 50 ml con un tampón de formulación final (FFB). El FFB es Plasmalyte A con HSA al 1%. Las células reactivadas se centrifugaron, se extrajo el sobrenadante y se resuspendieron en FFB. Éstas se denominan células en tampón de formulación (CFB).

Las CFB se resuspendieron en FFB a una concentración  $10^7$  células por ml. Las CFB se resuspendieron para administración ID, IT o IV. Se añadió 1 ml de la suspensión celular a una jeringa de 3 ml como una formulación ID. La formulación para IT e IV fue de 3 ml y 5 ml, respectivamente. Las jeringas con las formulaciones apropiadas se almacenaron en refrigeración con una temperatura promedio de aproximadamente 4°C.

**Recogida de muestras después del almacenamiento:** Las células y el sobrenadante se recogieron a diferentes puntos de tiempo. Los puntos de tiempo fueron los siguientes: 0 (inicial); 2 horas a temperatura ambiente (TA); 48 horas a 4°C; y 48 horas a 4°C seguido de 2 horas a TA.

En cada punto de tiempo, se recogieron 100 µl de suspensiones celulares y se centrifugaron las células a 400 g durante 5 min a 4°C. A continuación, el sobrenadante se transfirió a otro tubo para la detección posterior de IFN-γ mediante ELISA. Las células se resuspendieron en 150 µl de tampón de tinción mediante citometría de flujo. En algunos experimentos, las células se resuspendieron en 100 µl de medio cRPMI y se cultivaron en el incubador a

37°C durante 24 horas con el 5% de CO<sub>2</sub>. El sobrenadante se recogió después de 24 horas de incubación y se detectó el IFN- $\gamma$  mediante ELISA.

**Citometría de flujo (CD40L y 7-AAD):** Se transfirieron 50  $\mu$ l de la suspensión celular anterior (150  $\mu$ l) en 3 tubos eppendorf, etiquetados como sin teñir, CD40L y 7-AAD, respectivamente. El tubo sin teñir se incubó en hielo durante 20 minutos. Para el tubo de CD40L, las células se preincubaron con inhibidor de unión a FcR, según las instrucciones del fabricante, durante 20 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 40  $\mu$ l de tampón de tinción (PBS + 1% FBS) y 10  $\mu$ l de anticuerpo PE-CD40L a la suspensión celular y se incubaron durante 20 minutos adicionales en hielo en la oscuridad.

Se analizó la viabilidad celular mediante citometría de flujo de 7-AAD. La 7-AAD se intercala en el ADN de las células muertas o dañadas, por lo tanto, la determinación de células positivas en 7-AAD es un indicador de la viabilidad celular. Para los tubos de 7-AAD, los tubos se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos a 6°C. Después de extraer el sobrenadante, se resuspendieron los sedimentos celulares en 100  $\mu$ l de una solución de 1x7-AAD. El tubo se incubó en hielo durante 15 minutos en la oscuridad. Se añadió 1 ml de tampón de tinción al tubo de CD40L y, a continuación, los 3 tubos se centrifugaron juntos. Después de descartar el sobrenadante, los sedimentos celulares se resuspendieron en 0,4 ml de tampón de tinción y se desarrolló una FACS.

Ejemplo 1: Purificación y fenotipado celular de células CD4+. Se obtuvo sangre periférica de donante normal y se purificaron las células CD4+ a partir de la capa leucocitaria utilizando esferas magnéticas Miltenyi y una columna obtenida de Miltenyi Biotec (Auburn, CA). La figura 1 es una representación de la citometría de flujo de dispersión lateral (mide el tamaño y la densidad de las células) frente a CD4. La figura 1 muestra que las células CD4+ son aproximadamente el 46% de la población total (N = 22). Después de la selección positiva para células CD4+, el resultado es el 98,69% de células CD4+ puras (N = 22). Tal como puede observarse a partir de la figura 1B, la población de CD4 + después de la columna contiene tanto linfocitos como monocitos.

Dado que cada lote se produce de un donante diferente, se analizaron marcadores de antígenos al principio y al final de la producción. Se analizó la fenotipificación celular de células CD4+ (figura 2A) frente a células activadas en cultivo (CAC) (figura 2B). Los resultados muestran un cambio muy consistente de un fenotipo de CD4+ sin modificar (CD45RA+) a un fenotipo de memoria (CD45RO+). La figura 2A muestra los fenotipos de las células CD4+ para CD45RA, CD45RO y CD25, respectivamente. La figura 2B muestra los fenotipos de las CAC después de 9 días de cultivo y el análisis de la expresión en superficie de CD45RA, CD45RO y CD25, respectivamente. A partir de una población mixta de CD45RA/CD45RO, se obtiene una población positiva en CD45RO y negativa en CD45RA. Las células CD25+ son aproximadamente el 10% al inicio del proceso de expansión. En el día 9, las células CD25+ fueron aproximadamente el 85%. Esto está en concordancia con el estado de activación de las células. La figura 2A muestra que las células CD4+ después de la columna muestran un fenotipo sin modificar de células CD45RA+ (promedio = 44,76% n = 29), CD45RO+ (promedio = 53,44% n = 29) y CD25+ (promedio = 10,83% n = 29). La figura 2B muestra que después de 9 días en cultivo con estimulación continuada, el fenotipo cambia en células Th de tipo memoria. CD45RA disminuye drásticamente (promedio = 4,22% n = 29), CD45RO+ aumenta hasta el promedio de 97,8 (n = 29), y CD25+ también aumenta hasta el promedio de 90,03% (n = 29).

Patrón de expresión de CD62L: La figura 3 muestra que en el día 0, las células de siembra CD4+ expresan una intensidad de fluorescencia promedio (MFI) de CD62L bimodal con un pico máximo a aproximadamente 10<sup>3</sup> (la media aritmética promedio es 541, n = 17). La MFI aumenta después de 9 días en cultivo hasta una media aritmética promedio de 1.541 (CAC) y, a continuación, disminuye significativamente (media aritmética promedio de 190,3) después de la activación final de 4 horas (CFB).

Patrón de expresión de CD40L: La densidad de la expresión de CD40L en CAC aumentó de forma constante en la superficie de CAC después de una activación de 4 horas con esferas de CD3/CD28. La figura 4 muestra el cambio en la media aritmética y el porcentaje de expresión de CD40L de un lote representativo comparando CD4+ en el día 0 (figura 4A), CAC recogidas el día 9 antes de la activación final (figura 4B) y después de 4 horas de activación, CFB (figura 4C). Tal como puede observarse, la diferencia entre las células no activadas y las células activadas no es tanto en el porcentaje de células CD40L+, sino más bien en la media aritmética (la media aritmética promedio para CAC es 20 (n = 29), mientras que el promedio para CFB es de 112 (n = 29)).

Secreción de citoquinas durante la activación final: Se activaron muestras de células CAC recogidas el día 9 de cada lote de producción con esferas de CD3/CD28 durante 4 horas y se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para la producción de citoquinas (IFN $\gamma$ , IL-4, IL-8, TNF $\alpha$  y GM-CSF) utilizando un ensayo ELISA. La tabla 1 muestra los resultados de estos experimentos.

Tabla 1

| Código de lote             | IFN $\gamma$   | IL4         | GM-CSF         | TNF $\alpha$   |
|----------------------------|----------------|-------------|----------------|----------------|
| 068C                       | 2.178,3        | 0,00        | 647,9          | 1.338,3        |
| 069C                       | 2.500,0        | 0,00        | 809,9          | 1.245,8        |
| 070C                       | 5.469,1        | 0,00        | 1.595,9        | 1.994,9        |
| 071C                       | 6.995,4        | 0,00        | 1.739,3        | 2.799,0        |
| 072C                       | 806,6          | 0,00        | 251,1          | 117,7          |
| 073C                       | 2.931,5        | 0,00        | 596,6          | 358,3          |
| 074C                       | 462,9          | 0,00        | 0,0            | 105,3          |
| 075C                       | 2.722,5        | 0,00        | 927,0          | 1.189,7        |
| 076C                       | 4.118,0        | 0,30        | 752,0          | 576,7          |
| 078C                       | 1.072,0        | 0,00        | 294,2          | 393,1          |
| 080C                       | 3.846,7        | 0,90        | 1.878,4        | 1.828,4        |
| 081C                       | 9.702,8        | 0,35        | 9.030,4        | 1.522,9        |
| 082C                       | 6.662,4        | 0,76        | 3.984,9        | 869,0          |
| 083C                       | 910,8          | 0,00        | 344,4          | 365,5          |
| 087C                       | 2.257,6        | 0,00        | 764,6          | 736,8          |
| 088C                       | 4.342,1        | 0,00        | 2.539,4        | 3.961,5        |
| 090C                       | 1.021,4        | 1,00        | 402,0          | 810,5          |
| 094C                       | 1.420,2        | 1,03        | 733,6          | 757,2          |
| 097C                       | 703,2          | 1,16        | 327,7          | 989,4          |
| <b>Promedio<br/>(n=15)</b> | <b>3.816,0</b> | <b>0,29</b> | <b>1.779,7</b> | <b>1.358,8</b> |

5 Sólo se utilizaron los valores de IFN $\gamma$  e IL-4 para criterios de liberación funcional. Los resultados para 19 lotes consecutivos se muestran en la tabla 1 (los valores se expresan como pg/10<sup>6</sup> células/4 horas). El promedio indicado incluye sólo los lotes pasantes.

10 Ejemplo 2: Destrucción directa por células Th1/asesinas activadas. Para analizar si las CFB pueden tener un efecto directo sobre las células tumorales, se analizó la capacidad de las células de destruir la línea celular ARH77. Esta línea celular es una línea celular de mieloma establecida. Las células ARH77 se tiñeron en CFSE para diferenciarlas de las CFB. Las CFB se mezclaron con las células ARH77 teñidas a diferentes proporciones de células efectoras (CFB) con respecto a células diana (ARH77) durante 18 horas. Después de ese tiempo, se añadió 7AAD y las células se adquirieron utilizando el citómetro de flujo FC500MPL. Este experimento se repitió con diferentes lotes de CAC y con CFB frescas y descongeladas. Las ARH77 solas, con esferas Dynabeads, células CD4+ o con CAC no presentaron una muerte significativa (menos del 10%) (datos no mostrados). Los resultados mostrados en la figura 5 indican que las CFB, pero no las CAC, células CD4+ o esferas, tienen un efecto de destrucción directa en la línea celular ARH77.

20 La naturaleza del efecto de destrucción directa se examinó para ver si el efecto era debido al mecanismo de perforina-granzima. Se utilizaron técnicas de tinción y transferencia western para teñir la perforina y la granzima B. La figura 6A muestra que las CAC expresan muy poco granzima B, tal como puede observarse. La figura 6B muestra que las CFB expresan una cantidad significativa de granzima B. La figura 6C muestra que la perforina sólo se puede detectar mediante la utilización de transferencia western. El carril 1 es el extracto de PBMC activadas, como control positivo. Los carriles 2 y 4 son de CAC de diferentes lotes y los carriles 3 y 5 son de CFB de los mismos lotes.

30 También se realizaron ensayos de inhibición para elucidar la naturaleza del mecanismo de destrucción directa. Las células CFB se mezclaron con células ARH77, tal como se ha descrito anteriormente, y se añadieron diferentes agentes inhibidores, tal como se muestra a continuación en la tabla 2. Se añadieron anticuerpos contra CD40L y/o FAS-L a la mezcla de CFB:ARH77. La tabla 2 muestra la concentración más elevada no evitó el perfil de destrucción.

Tabla 2:

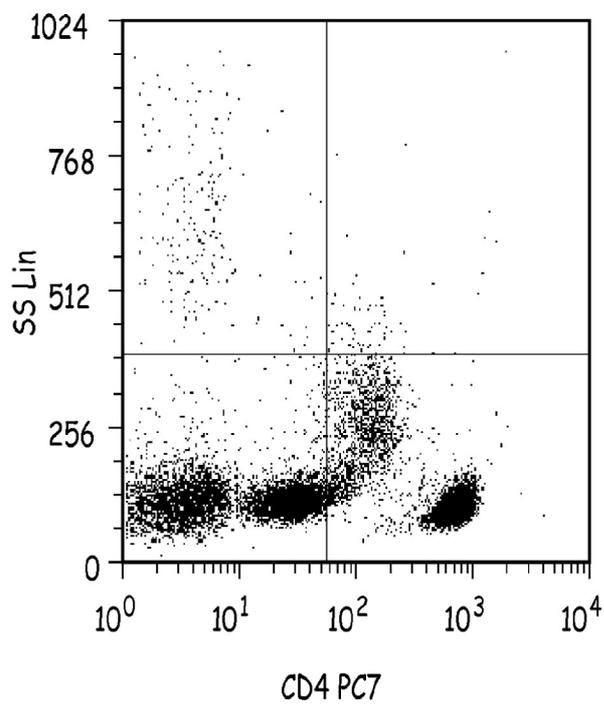
|                                    | <b>Anticuerpo<br/>contra C40L</b> | <b>sin inhibición</b> | <b>0,1µg/ml</b> | <b>1µg/ml</b> | <b>20µg/ml</b> |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------|---------------|----------------|
| <b>Anticuerpo<br/>contra Fas-L</b> |                                   |                       | 35,48           | 35,99         | 35,5           |
| <b>sin inhibición</b>              |                                   | 33,85                 |                 |               |                |
| <b>1ng/ml</b>                      | 36,55                             |                       | 34,55           |               |                |
| <b>10ng/ml</b>                     | 38,86                             |                       |                 |               |                |
| <b>200ng/ml</b>                    | 38,97                             |                       |                 |               | 30,0           |

- 5 Se examinó el efecto de EGTA sobre el mecanismo de destrucción directa. El EGTA bloquea la polimerización de perforina y actúa como un inhibidor del mecanismo de perforina/granzima B. Se añadió EGTA 1 mM al ensayo de destrucción directa descrito anteriormente. Tal como se muestra en la figura 7, EGTA 1 mM redujo la destrucción en un promedio del 50% (n = 7). Valor P de prueba t emparejada de 0,0002. El efecto de destrucción directa que muestran las CFB proviene del mecanismo de perforina-granzima.

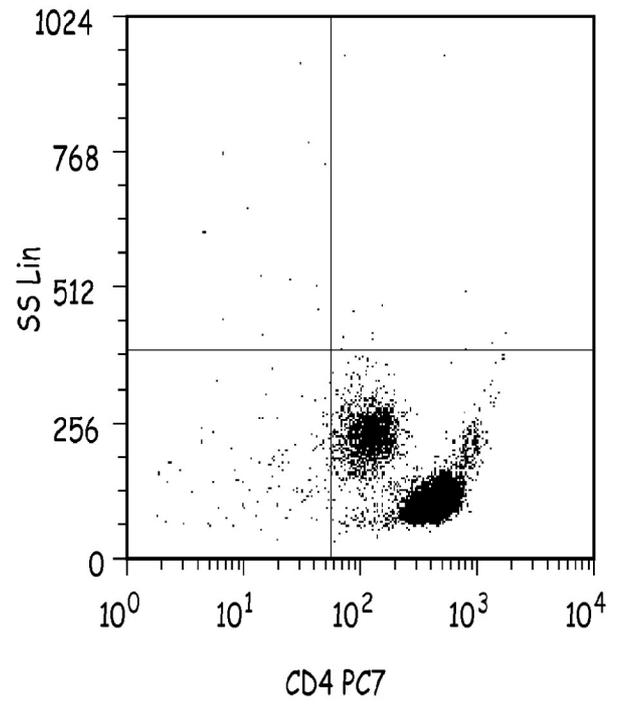
10

**REIVINDICACIONES**

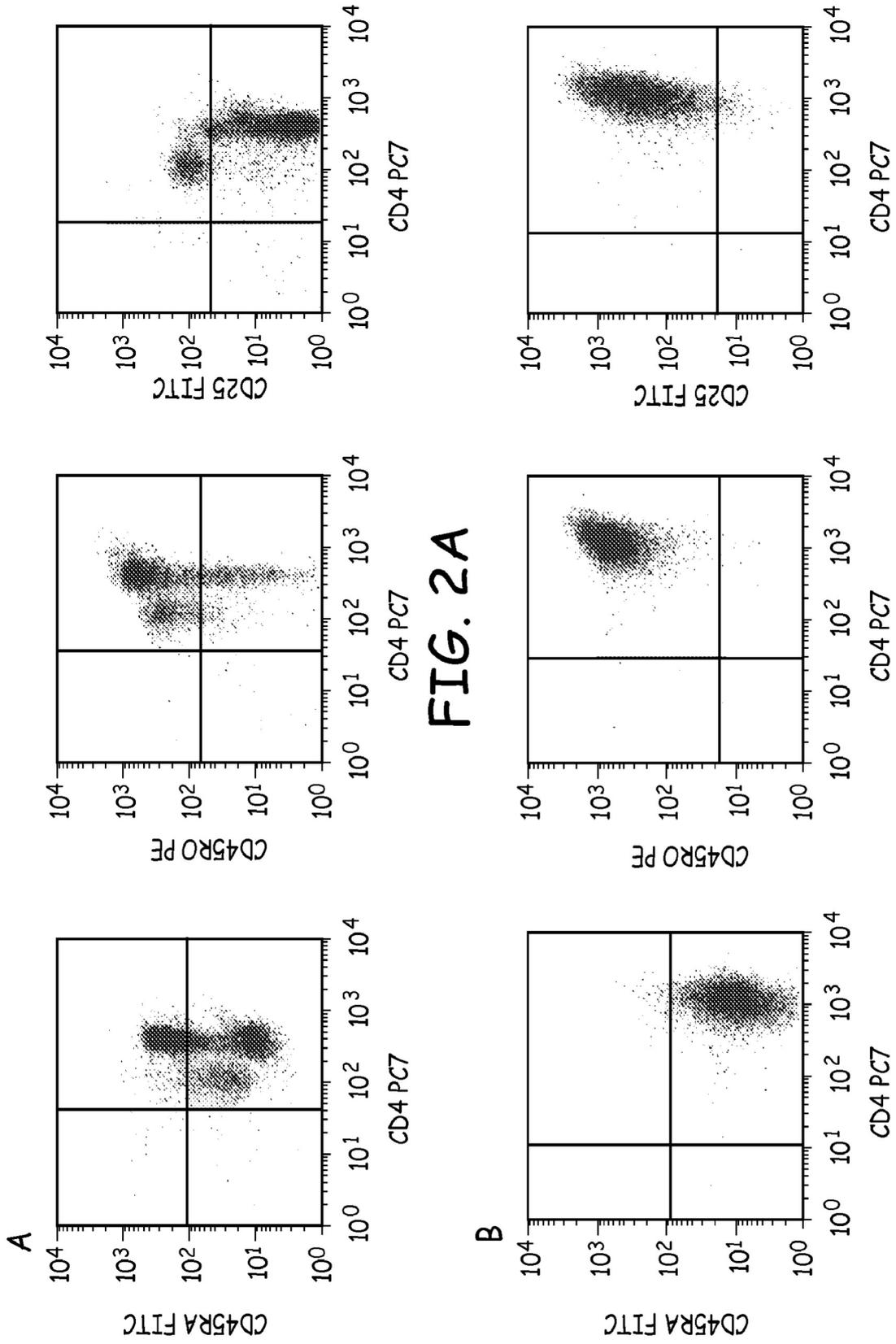
- 5 1. Composición que comprende células CD4+ Th1/asesinas activadas que tienen características de Th1 y actividad citolítica directa contra una línea celular tumoral, en la que las células Th1/asesinas son células CD4+ activadas *ex vivo* que expresan granzima B y perforina obtenidas mediante la activación de células CD4+ sin modificar mediante la reticulación de las moléculas de la superficie celular CD3 y CD28 sin la adición de citoquinas exógenas, la congelación de las células activadas y, a continuación, la reactivación de las células mediante la reticulación de las moléculas de la superficie celular CD3 y CD28.
- 10 2. Composición, según la reivindicación 1, en la que la actividad citolítica comprende características de NK.
3. Composición, según la reivindicación 1, en la que las células Th1/asesinas expresan IFN-gamma.
- 15 4. Composición, según la reivindicación 1, en la que las células Th1/asesinas han reducido sustancialmente la expresión o no expresan IL-4.
5. Composición, según la reivindicación 1, en la que las células Th1/asesinas derivan de la sangre periférica de un donante sano.
- 20 6. Composición, según la reivindicación 1, en la que la composición comprende, como mínimo, aproximadamente  $1 \times 10^7$  células.
7. Composición, según la reivindicación 1, en la que la composición comprende, como mínimo, aproximadamente  $1 \times 10^8$  células.
- 25 8. Composición, según la reivindicación 1, en la que la actividad citolítica de las células Th1/asesinas inactiva específicamente las células enfermas y no las células obtenidas de donantes sanos, y en la que las células enfermas comprenden, de manera preferente, células cancerosas, células infectadas o combinaciones de las mismas.
- 30 9. Composición, según la reivindicación 1, en la que la línea celular tumoral es ARH77.
10. Procedimiento *in vitro* para destruir células enfermas que comprende poner en contacto las células enfermas con una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la interacción de las células enfermas directamente con las células CD4+ Th1/asesinas activadas de la composición conduce a la destrucción de las células enfermas.
- 35 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que las células enfermas comprenden células cancerosas, células infectadas o una combinación de las mismas.
- 40 12. Composición que comprende células CD4+ Th1/asesinas activadas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para utilizar en el tratamiento de un paciente, en la que la composición comprende un número eficaz de células Th1/asesinas.
- 45 13. Composición para uso, según la reivindicación 12, en la que las células Th1/asesinas son alogénicas para el paciente.



**FIG. 1A**



**FIG. 1B**



**FIG. 2A**

**FIG. 2B**

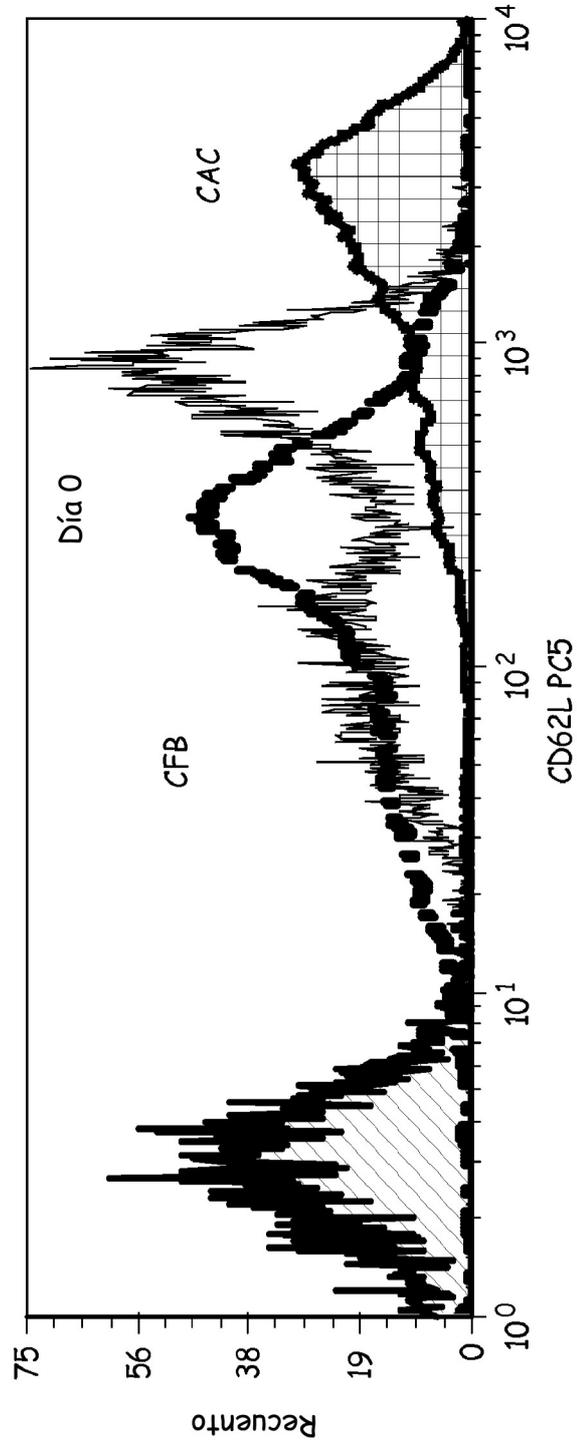


FIG. 3

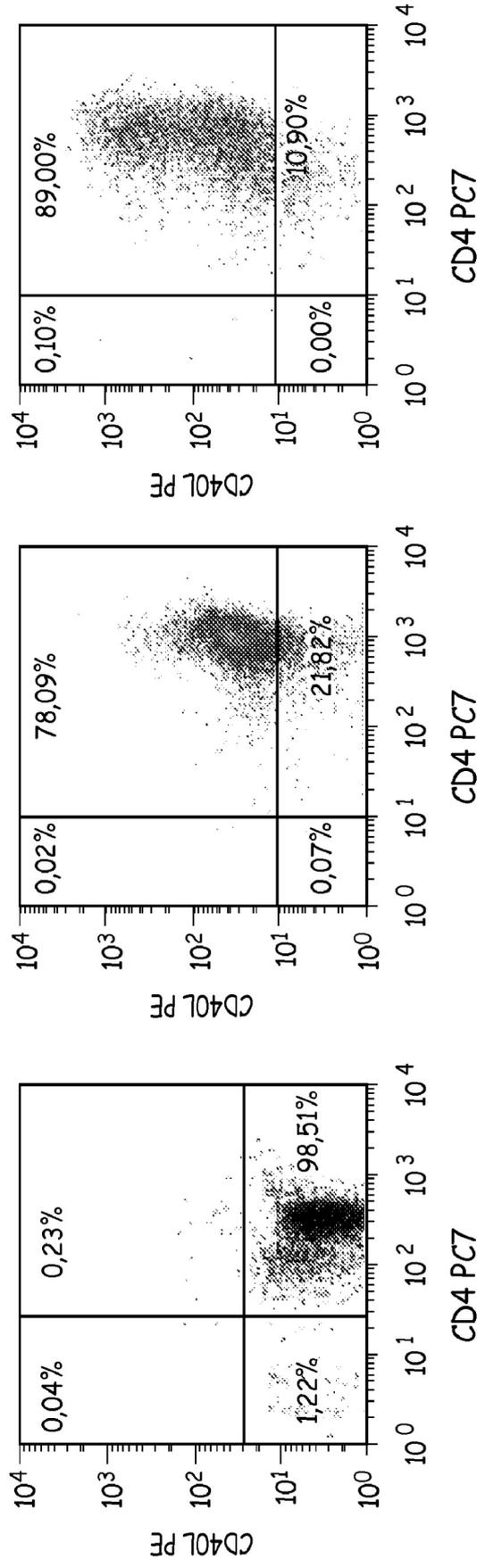


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

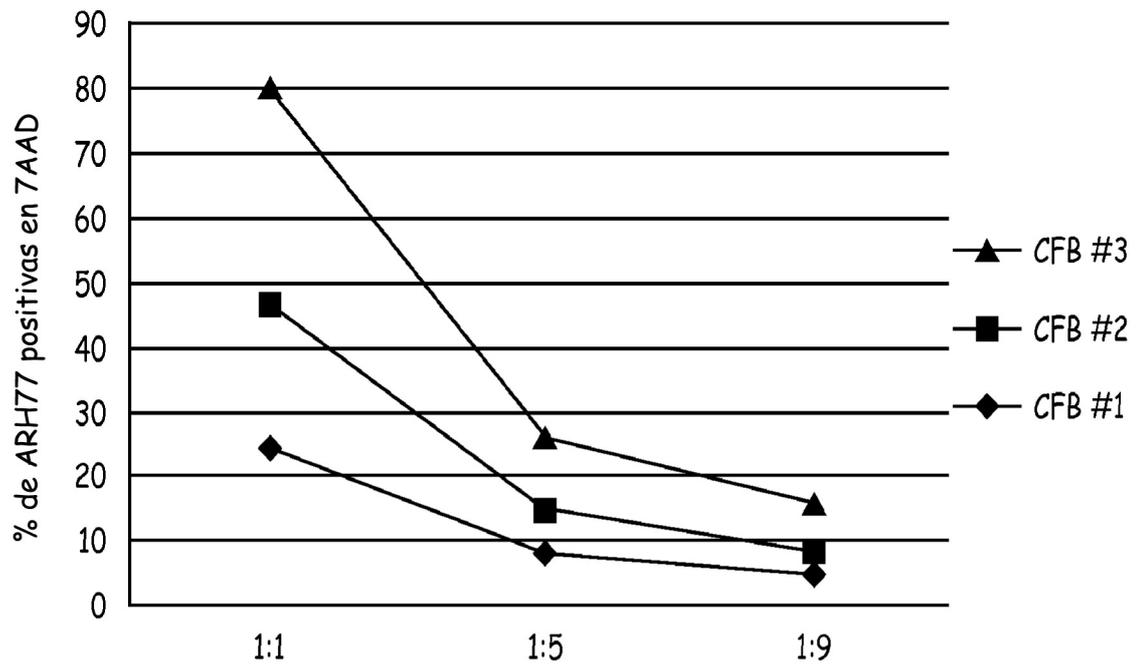


FIG. 5

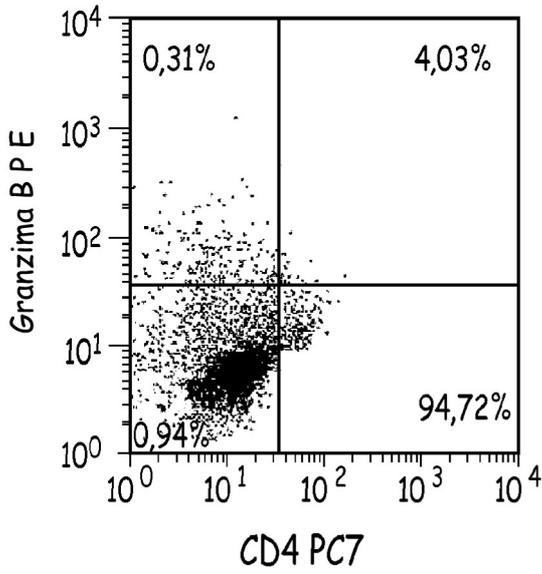


FIG. 6A

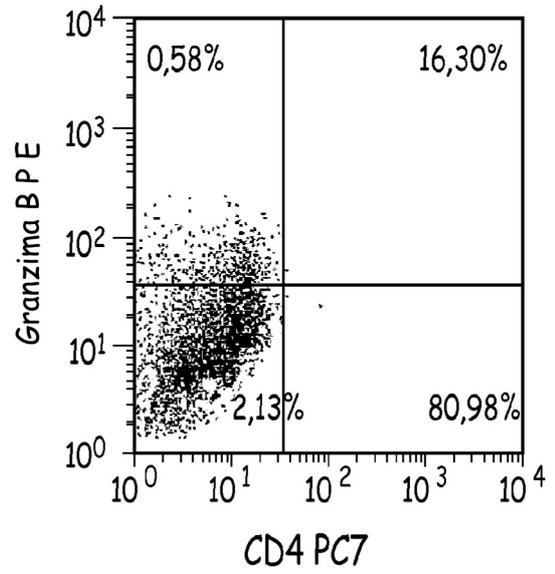


FIG. 6B

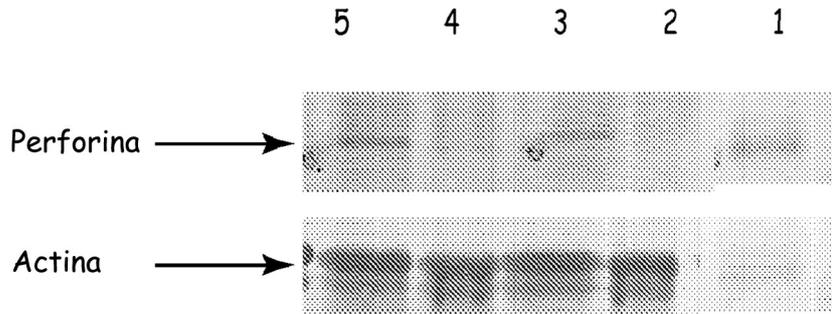


FIG. 6C

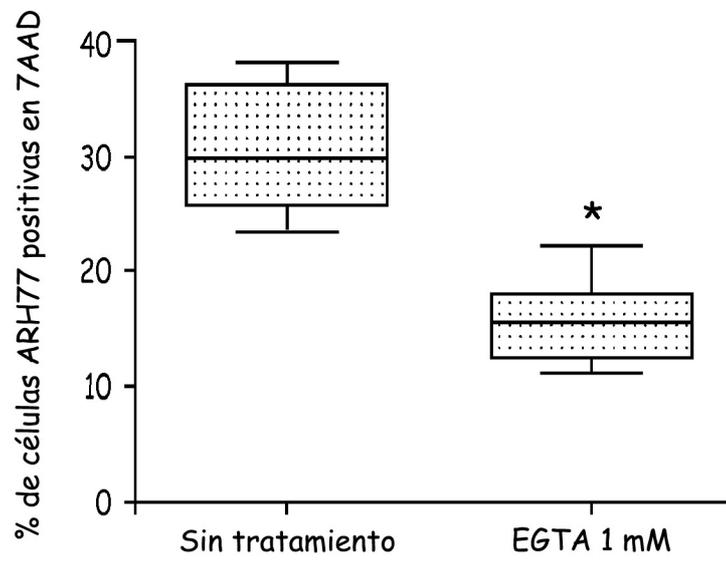


FIG. 7