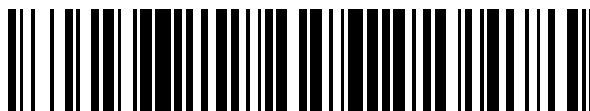


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 215**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2016 PCT/EP2016/075644**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2017 WO17202478**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2016 E 16785490 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3265555**

54 Título: **Expansión de linfocitos T**

30 Prioridad:

24.05.2016 US 201662340605 P
11.10.2016 US 201615290230

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2020

73 Titular/es:

TESSA THERAPEUTICS LTD. (100.0%)
8 Temasek Boulevard, Suite 24-02, Suntec Tower
3
Singapore 038988, SG

72 Inventor/es:

WANG, PETER y
WU, CHUNXIAO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 742 215 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

Expansión de linfocitos T

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para generar y/o expandir poblaciones de linfocitos T específicos de virus.

10 **Antecedentes de la invención**

La transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de virus es una estrategia prometedora para la prevención y el tratamiento de enfermedad viral.

15 La transferencia adoptiva requiere el uso de una gran cantidad de linfocitos T. Por ejemplo, Chia *et al.*, *Mol Ther* (2014) 22(1): 132-139 describen el tratamiento del carcinoma nasofaríngeo (NPC) positivo para EBV mediante transferencia adoptiva de un número medio total de $9,6 \times 10^8$ EBV-CTL (variando de $6,3$ a $10,3 \times 10^8$ CTL). Los métodos para generar/expandir linfocitos T específicos de virus se describen en Chia *et al. supra*, Straathof *et al.*, *Blood* (2005), 105(5): 1898-1904, Redchenko *et al.*, *J Virol* (1999) 73(1): 334-342, Lalvani *et al.*, *J Immunol Methods* (1997) 210: 65-77, Borysiewicz *et al.*, *Eur J Immunol* (1988) 18:269-275 y Munn *et al.*, *J Exp Med* (1999) 189: 1363-1372.

25 Un problema importante para la terapia mediante transferencia adoptiva de linfocitos T es el periodo de tiempo necesario para generar un número suficientemente grande de linfocitos T específicos de virus para administración. Chia *et al. (supra)* informaron que el promedio de tiempo necesario para producción y la primera dosis de CTL fue de 13 semanas (variando de 8 a 22 semanas). Además, en este estudio se informa que para 3 pacientes hubo una desviación de la terapia programada debido a retrasos en la producción de CTL.

30 **Sumario de la invención**

Los métodos para generar y/o expandir poblaciones de linfocitos T específicos de virus incluyen normalmente varias rondas de estimulación de linfocitos T con células presentadoras de antígeno que presentan el péptido del virus de interés (es decir, el virus para el cual los linfocitos T son específicos).

35 La presente invención se basa en el hallazgo de que las poblaciones de linfocitos T específicos de virus pueden expandirse más rápidamente realizando reestimulaciones en presencia de medios acondicionados obtenidos de una etapa de estimulación. Ventajosamente, se pueden obtener grandes cantidades de linfocitos T específicos de virus en un periodo de tiempo más corto en comparación con los métodos de la técnica anterior. Por lo tanto la presente invención es útil para generar/expandir poblaciones de linfocitos T específicos de virus para uso en investigación y/o aplicaciones terapéuticas.

45 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus, que comprende estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación que comprende linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para acelerar la velocidad de expansión de una población de linfocitos T específica de virus, el método comprendiendo la estimulación de linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación que comprende linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus, que comprende:

- 60 (i) estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus; y
 (ii) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus, en donde el método comprende:

- (i) estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que

presentan un péptido del virus;

(ii) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus; y

(iii) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus. En algunas realizaciones del método los medios acondicionados se obtienen del cultivo de estimulación de la etapa (ii).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus, que comprende:

(i) estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus;

(ii) recoger las células obtenidas en la etapa (i), y;

(iii) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus, en donde el método comprende:

(i) estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus;

(ii) recoger las células obtenidas en la etapa (i);

(iii) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus;

(iv) recoger las células obtenidas en la etapa (iii); y

(v) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus. En algunas realizaciones del método los medios acondicionados se obtienen del cultivo de estimulación de la etapa (iii).

En relación con los diversos aspectos de la presente invención, en algunas realizaciones los medios acondicionados se obtienen de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus después de un periodo de cultivo de 1 a 8 días. En algunas realizaciones, los medios acondicionados se obtienen de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC en una relación respondedor:estimulador de 1:1 a 10:1. En algunas realizaciones, las APC que presentan un péptido del virus son células de la línea celular linfoblastoidea (LCL) transformada por EBV. En algunas realizaciones, del 10 % al 25 % de los medios acondicionados es preferentemente aproximadamente el 15 % de los medios acondicionados.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica del virus de Epstein-Barr (EBV), que comprende estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días, en medios que comprenden:

(a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM,

(b) 10 % a 25 % de medios acondicionados obtenidos por un método que comprende: estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 en medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, y añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 UI/ml, durante un periodo de 1 a 8 días, y

(c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 UI/ml.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para acelerar la velocidad de expansión de una población de linfocitos T específica del virus de Epstein-Barr (EBV), que comprende estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días, en medios que comprenden:

(a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM,

(b) 10 % a 25 % de medios acondicionados obtenidos por un método que comprende: estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 en medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, y añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 UI/ml, durante un periodo de 1 a 8 días, y

(c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 UI/ml.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica del virus de Epstein-Barr (EBV), que comprende:

- 5 (i) estimular los linfocitos T mediante cultivo de PBMC en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 10:1 a 80:1 en medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM durante un periodo de 7 a 14 días;
- (ii) recoger las células obtenidas en la etapa (i);
- 10 (iii) reestimar los linfocitos T mediante el cultivo de células recogidas en la etapa (ii) en presencia de LCL transformadas con EBV a una relación de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 en medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, y añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 UI/ml, durante un periodo de 1 a 8 días;
- (iv) recoger las células obtenidas en la etapa (iii), y;
- 15 (v) reestimar los linfocitos T mediante cultivo de células recogidas en la etapa (iv) en presencia de EBV transformado en una relación de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días en medios que comprenden: (a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, (b) 10 % a 25 % de medios acondicionados obtenidos en el punto final de la etapa (iii), y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 (por ejemplo, 40-100) UI/ml. En algunas realizaciones, el método además comprende:
- 20 (vi) recoger las células obtenidas en la etapa (v), y;
- (vii) reestimar los linfocitos T mediante el cultivo de células recogidas en la etapa (vi) en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días en medio que comprende: (a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, (b) 10 % a 25 % de medio acondicionado
- 25 obtenido en el punto final de la etapa (v), y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 (por ejemplo, 40-100) UI/ml. En algunas realizaciones, el método comprende etapas adicionales de recolección de células y reestimulación de linfocitos T mediante el cultivo de las células recolectadas en presencia de LCL transformadas con EBV (por ejemplo, LCL irradiadas, transformadas con EBV) en una relación de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 por un periodo de 1 a 8 días en medios que comprenden: (a) medios de cultivo celular que comprenden
- 30 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, (b) 10 % a 25 % de medio acondicionado obtenido en el punto final de la etapa de estimulación precedente, y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 UI/ml.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto, comprendiendo el método:

- (1) aislar linfocitos T de un sujeto;
- (2) generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus mediante un método que comprende: estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus, en donde del 10 al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación que comprende linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus; y
- 40 (3) administrar la población generada o expandida de linfocitos T a un sujeto.

45 En algunas realizaciones, los medios acondicionados se obtienen de un cultivo de estimulación que comprende linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus en una relación respondedor:estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días. En algunas realizaciones, la estimulación de linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus comprende el cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días, en medios que comprenden:

50 (a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, (b) 10 % a 25 % de medios acondicionados obtenidos por un método que comprende: estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 en medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, y añadir IL-2 a una concentración final de 10-200

55 UI/ml, durante un periodo de 1 a 8 días, y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 UI/ml. En algunas realizaciones, las APC que presentan un péptido del virus son células de la línea celular linfoblastoidea (LCL) transformada por EBV. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer positivo para EBV. En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma nasofaríngeo (NPC) positivo para EBV. En algunas realizaciones, aproximadamente el 15 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados. En algunas

60 realizaciones, la etapa (2) comprende adicionalmente: recolectar la población generada o expandida de linfocitos T.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto, comprendiendo el método:

- 65 (1) aislar linfocitos T de un sujeto;
- (2) generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus mediante un método que

comprende: estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus, en donde del 10 al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados, en donde los medios acondicionados se obtienen de un cultivo de estimulación que comprende linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus en una relación respondedor:estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días; y
 5 (3) administrar la población generada o expandida de linfocitos T a un sujeto.

En algunas realizaciones, la estimulación de linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus comprende el cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días, en medios que comprenden: (a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, (b) 10 % a 25 % de medios acondicionados obtenidos por un método que comprende: estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 en medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, y añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 IU/ml, durante un periodo de 1 a 8 días, y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 IU/ml. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer positivo para EBV. En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma nasofaríngeo (NPC) positivo para EBV. En algunas realizaciones, aproximadamente el 15 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados. En algunas realizaciones, la etapa (2) comprende
 10 adicionalmente: recolectar la población generada o expandida de linfocitos T.
 15
 20

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus, que comprende estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación que comprende linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus.
 25

En algunas realizaciones, los medios acondicionados se obtienen de un cultivo de estimulación que comprende linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus en una relación respondedor:estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días. En algunas realizaciones, la estimulación de linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus comprende el cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días, en medios que comprenden: (a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, (b) 10 % a 25 % de medios acondicionados obtenidos por un método que comprende: estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 en medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, y añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 UI/ml, durante un periodo de 1 a 8 días, y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 UI/ml. En algunas realizaciones, las APC que presentan un péptido del virus son células de la línea celular linfoblastoidea (LCL) transformada por EBV. En algunas realizaciones, del 10 % al 25 % de los medios acondicionados es aproximadamente el 15 % de los medios acondicionados. En algunas realizaciones, el método además comprende: recolectar la población generada o expandida de linfocitos T. En algunas realizaciones, el método además comprende: mezclar la población generada o expandida de linfocitos T con un vehículo farmacéuticamente aceptable, adyuvante, excipiente o diluyente.
 30
 35
 40

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de linfocitos T específica para un virus, en donde la población de linfocitos T se obtiene mediante, es obtenible por, o es el producto de, un método de acuerdo con la presente divulgación.
 45

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una población de linfocitos T de acuerdo con la presente divulgación, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, adyuvante, excipiente o diluyente.
 50

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una población de linfocitos T o composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno.
 55

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de una población de linfocitos T o composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación en la fabricación de un medicamento o vacuna para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno.
 60

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de una población de linfocitos T o composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación.
 65

En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es causada o exacerbada por una infección con el virus para el cual los linfocitos T son específicos, o es una enfermedad o trastorno para el cual la infección con el virus para el cual los linfocitos T son específicos es un factor de riesgo. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es un cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer positivo para EBV. En algunas realizaciones, el cáncer es

un carcinoma nasofaríngeo (NPC) positivo para EBV.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit de partes que comprende una cantidad predeterminada de una población de linfocitos T o composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación.

5

Descripción

Linfocitos T y células presentadoras de antígeno

10 La presente invención se refiere a la generación y/o expansión de poblaciones de linfocitos T específicos de virus.

Como se usa en el presente documento, un linfocito T específico de virus es un linfocito T reactivo a células infectadas con, o que comprende un péptido de, un virus. Un linfocito T específico de virus comprende un receptor de linfocitos T (TCR) capaz de unirse a una molécula de MHC que presenta un péptido del virus para el cual el linfocito T es específico.

15

Los receptores de linfocitos T (TCR) son moléculas de unión a antígeno, heterodiméricas que comprenden normalmente una cadena α y una cadena β . En la naturaleza, las cadenas α y las cadenas β se expresan en la superficie celular de los linfocitos T (linfocitos T $\alpha\beta$) como un complejo con cadenas CD3 invariantes. Un TCR alternativo que comprende cadenas γ y δ se expresa en un subconjunto de linfocitos T (linfocitos T $\gamma\delta$). Los TCR reconocen (se unen) al péptido antigénico presentado por las principales moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC).

20

La estructura del TCR y el reconocimiento del complejo péptido-MHC se describe en detalle, por ejemplo, en Immunobiology, 5ª Edn. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, *et al.* New York: Garland Science (2001), Capítulos 3 y 6.

25

Los linfocitos T pueden caracterizarse por referencia a la expresión en superficie de uno o más de: un polipéptido TCR (por ejemplo, cadena α , β , γ o δ), un polipéptido CD3 (por ejemplo, cadena γ , δ o ϵ), CD8 y CD4. La expresión de la superficie de un polipéptido dado puede medirse mediante varios métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo por métodos basados en anticuerpos como inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, y citometría de flujo.

30

Los linfocitos T expandidos de acuerdo con los métodos de la presente invención comprenden un TCR específico para un virus. En algunas realizaciones los linfocitos T son linfocitos T CD3+ CD8+. En algunas realizaciones, los linfocitos T son linfocitos T citotóxicos. En algunas realizaciones, los linfocitos T son linfocitos T CD3+ CD4+. En algunas realizaciones, los linfocitos T son linfocitos T auxiliares. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención son para generar y/o expandir una población de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de virus y linfocitos T auxiliares.

35

Los CTL son capaces de efectuar la muerte celular en células infectadas con un virus mediante la liberación de factores citotóxicos incluyendo perforina, granzimas, granzulina, y/o inducir apoptosis de la célula infectada al unir FAS en la célula infectada a través de FASL expresado en el linfocito T (descrito por ejemplo por Chavez-Galan *et al.*, Cellular and Molecular Immunology (2009) 6(1): 15-25). La citotoxicidad se puede investigar, por ejemplo, usando cualquiera de los métodos revisados en Zaritskaya *et al.*, Expert Rev Vaccines (2011), 9(6):601-616. Un ejemplo de un ensayo de citotoxicidad de un linfocito T para una célula diana es el ensayo de liberación de ^{51}Cr , en que las células diana se tratan con ^{51}Cr , que internalizan. La lisis de las células diana por los linfocitos T da como resultado la liberación del ^{51}Cr radioactivo en el sobrenadante del cultivo celular, que se puede detectar.

45

El péptido del virus presentado por las APC puede derivarse de una partícula viral, o puede estar codificado por el ácido nucleico del virus. Como se usa en el presente documento un "péptido" se refiere a una cadena de dos o más monómeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, que tiene 50 aminoácidos o menos de longitud.

50

El péptido viral es presentado por una molécula MHC de clase I o clase II. Las moléculas de MHC de clase I son heterodímeros de una cadena α y una microglobulina β_2 . La cadena α tiene tres dominios designados como α_1 , α_2 y α_3 . Los dominios α_1 y α_2 juntos forman el surco al que se une el péptido presentado por la molécula MHC de clase I, para formar el complejo péptido-MHC. Las cadenas α de MHC de clase I son polimórficas, y diferentes cadenas α son capaces de unirse y presentar diferentes péptidos. Igual que las moléculas MHC clase I, las moléculas de MHC de clase II también son heterodímeros, y consisten en una cadena α y una cadena β . En los seres humanos, Las cadenas α y β de MHC de clase I y las cadenas α y β de MHC de clase II están codificadas por genes de antígeno leucocitario humano (HLA).

55

60

Los linfocitos T específicos de virus de acuerdo con la presente descripción comprenden un TCR que es capaz de unirse a un péptido del virus para el cual el linfocito T es específico, presentado por una molécula MHC clase I o MHC clase II.

65

El virus para el cual los linfocitos T son específicos puede ser un virus de ADNds (por ejemplo, adenovirus,

- herpesvirus, poxvirus), virus de ARNss (por ejemplo, parvovirus), virus ARNds (por ejemplo, reovirus), virus (+)ARNss (por ejemplo, picornavirus, togavirus), virus (-)ARNss (por ejemplo, ortomixovirus, rabdovirus), virus ARNss-RT (por ejemplo, retrovirus) o virus ADNds-RT (por ejemplo, hepadnavirus). La presente divulgación contempla virus de las familias adenoviridae, herpesviridae, papillomaviridae, polyomaviridae, poxviridae, hepadnaviridae, parvoviridae, astroviridae, caliciviridae, picornaviridae, coronaviridae, flaviviridae, togaviridae, hepeviridae, retroviridae, orthomyxoviridae, arenaviridae, bunyaviridae, filoviridae, paramyxoviridae, rhabdoviridae y reoviridae.
- Los virus asociados con una enfermedad o trastorno son de particular interés. En consecuencia, se contemplan los siguientes virus: adenovirus, virus del herpes simple tipo 1, virus del herpes simple tipo 2, virus de la varicela zóster, virus de Epstein Barr, citomegalovirus humano, virus del herpes humano tipo 8, virus del papiloma humano, virus BK, virus JC, viruela, virus de la hepatitis B, parvovirus B19, Astrovirus Humano, virus de Norwalk, virus coxsackie, virus de la hepatitis A, poliovirus, rinovirus, virus del síndrome respiratorio agudo severo, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo occidental, virus TBE, virus de la rubeola, virus de la hepatitis E, virus de inmunodeficiencia humana, virus de la gripe, virus de Lassa, Virus de la fiebre hemorrágica crimea-congo, Virus Hantaan, virus del ébola, virus de Marburgo, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de parainfluenza, virus sincitial respiratorio, virus de la rabia, virus de la hepatitis D, rotavirus, orbivirus, coltivirus, y virus banna.
- En algunas realizaciones, el virus es el virus de Epstein-Barr (EBV). En consecuencia, en algunas realizaciones el método es para generar o expandir una población de linfocitos T específica de EBV.
- En algunas realizaciones, el EBV es la cepa B95-8, P3HR-1, o un derivado de la misma.
- En la presente invención, el péptido viral es presentado por una célula presentadora de antígeno (APC). Las APC procesan polipéptidos por la maquinaria molecular para formar péptidos que luego se asocian con las moléculas de MHC y se presentan como complejos péptido-MHC en la superficie celular. Diferentes TCR muestran diferentes capacidades para unirse y, por lo tanto, diferentes reactividades para, diferentes complejos péptido-MHC.
- Los péptidos/polipéptidos virales se procesan y presentan en complejo con moléculas de MHC. El procesamiento de antígenos, carga y presentación en MHC se describe en detalle en, por ejemplo, Immunobiology, 5ª Edn. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, *et al.* New York: Garland Science (2001), capítulo 5.
- Los diferentes tipos de linfocitos T se activan a través de sus TCR mediante el reconocimiento de los complejos MHC-péptido. Los linfocitos T CD8+ reconocen los complejos péptido-MHC de clase I, mientras que los linfocitos T CD4+ reconocen los complejos péptido-MHC de clase II. La activación de linfocitos T requiere la unión del complejo péptido MHC para el cual el TCR del linfocito T tiene una alta afinidad en el contexto de una señal coestimuladora positiva de APC. El proceso de activación de linfocitos T es bien conocido por la persona experta y se describe en detalle, por ejemplo, en Immunobiology, 5ª Edn. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, *et al.* New York: Garland Science (2001), Capítulo 8.
- Las APC de acuerdo con la invención pueden ser APC profesionales. Las APC profesionales están especializados en presentar antígeno a los linfocitos T; son eficaces para procesar y presentar complejos de péptido MHC en la superficie celular y expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras. Las APC profesionales incluyen células dendríticas (DC), macrófagos, y linfocitos B. Las APC no profesionales son otras células capaces de presentar complejos MHC-péptido a los linfocitos T, en particular complejos MHC Clase I-péptido a linfocitos T CD8+.
- En relación con la presente invención, la APC puede ser cualquier célula que esté infectada con, o que comprenda o exprese un péptido de, el virus para el cual el linfocito T comprende una TCR específica. La célula infectada con, o que comprende o expresa un péptido de, el virus puede presentar un péptido del virus en el contexto de una molécula de MHC en la superficie celular.
- Se apreciará que la referencia a "un péptido" en el presente documento abarca péptidos plurales. Por ejemplo, Las APC que presentan un péptido del virus pueden presentar varios péptidos del virus.
- Las APC pueden comprender un alelo HLA que codifica una molécula MHC de clase I o clase II capaz de presentar el péptido del virus para el que es específica una TCR del linfocito T. En algunas realizaciones las APC pueden coincidir con HLA para el péptido viral reconocido por un TCR del linfocito T.
- En algunas realizaciones las APC pueden expresar o comprender un péptido del virus como resultado de estar infectado con el virus. En algunas realizaciones las APC pueden haber sido modificadas para comprender o expresar un péptido del virus. Por ejemplo, en algunas realizaciones la célula puede haber sido modificada para comprender ácido nucleico que codifica un péptido del virus, o puede haber sido pulsada con un péptido del virus.
- En algunas realizaciones, los péptidos virales se pueden proporcionar a las APC en una biblioteca de mezclas de péptidos, que pueden denominarse mezclas pep. En algunas realizaciones, existe una combinación de varias mezclas pep para exposición a APC. Las APC que presentan un péptido del virus pueden exponerse a linfocitos T

de sangre periférica bajo ciertas condiciones para dar como resultado la estimulación de linfocitos T específicos para ciertos péptidos virales.

5 En algunas realizaciones, las APC son linfocitos B o se derivan de los linfocitos B. En realizaciones particulares, las APC pueden ser células de una línea celular linfoblastoidea (LCL).

10 Las LCL se pueden preparar por transformación viral de linfocitos B. Las LCL se producen normalmente por transformación de linfocitos B con el virus de Epstein-Barr. La generación y las características de las LCL se describen en detalle, por ejemplo, en Hui-Yuen *et al.*, *J Vis Exp* (2011) 57: 3321, y Hussain y Mulherkar, *Int J Mol Cell Med* (2012) 1(2): 75-87. En resumen, las LCL se pueden producir por incubación de PBMC con sobrenadante de cultivo celular concentrado de células que producen EBV, por ejemplo células B95-8, en presencia de ciclosporina A.

15 En algunas realizaciones las APC se obtienen de, o se derivan de células obtenidas de, el mismo sujeto que el sujeto a partir del cual se genera o expande la población de linfocitos T. Esto es, en algunas realizaciones las APC y los linfocitos T son de origen autólogo. En algunas realizaciones, las APC se obtienen de, o se derivan de células obtenidas de, un sujeto diferente al sujeto a partir del cual se genera o expande la población de linfocitos T. Esto es, en algunas realizaciones las APC y los linfocitos T son de origen heterólogo.

20 En algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, las APC son LCL preparadas por transformación de linfocitos B con EBV, en donde los linfocitos B se obtienen del mismo sujeto que los linfocitos T usados en los métodos de la invención. En algunas realizaciones las LCL se preparan por transformación de linfocitos B obtenidos de un sujeto diferente al sujeto del que se obtienen los linfocitos T.

25 En algunas realizaciones, los linfocitos B usados para la preparación de LCL pueden obtenerse de una población de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que se obtiene del mismo individuo que la población de PBMC de la que se genera y/o expande la población de linfocitos T específica de virus de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, los linfocitos B usados para la preparación de LCL se obtienen de la misma población de PBMC a partir de la cual se genera y/o expande la población de linfocitos T específica de virus de acuerdo con la
30 invención.

35 En algunas realizaciones, las APC (por ejemplo, las LCL) se irradian o se tratan con una sustancia (por ejemplo, mitomicina C) para evitar su proliferación, antes del cultivo en presencia de los linfocitos T. La irradiación de LCL de acuerdo con los métodos actuales es normalmente de 6000 a 12000 rads.

40 Los presentes métodos son útiles para producir grandes cantidades de linfocitos T específicos de virus en un periodo de tiempo más corto en relación con los métodos de la técnica anterior para la generación/expansión de linfocitos T específicos de virus. En particular, los métodos son útiles para producir grandes cantidades de linfocitos T específicos de virus para la transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de virus para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades causadas o exacerbadas por el virus, o para las cuales la infección con el virus es un factor de riesgo.

45 Por ejemplo, cuando los métodos son para generar y/o expandir una población de linfocitos T específica de EBV, las células son útiles para tratar un trastorno asociado con el VEB como carcinoma nasofaríngeo (NPC) mediante transferencia adoptiva, por ejemplo, como se describe en Chia WK *et al.*, *Molecular Therapy* (2014), 22(1): 132-139.

50 La transferencia adoptiva de linfocitos T generalmente se refiere a un proceso por el cual los linfocitos T se obtienen de un sujeto, normalmente extrayendo una muestra de sangre. Luego los linfocitos T se tratan o alteran de alguna manera, y se devuelven al mismo sujeto o se introducen en otro sujeto. El tratamiento generalmente tiene como objeto proporcionar una población de linfocitos T con ciertas características deseadas a un sujeto, o aumentar la frecuencia de los linfocitos T con tales características en ese sujeto. La transferencia adoptiva de linfocitos T específicos de virus se describe, por ejemplo, en Cobbold *et al.*, (2005) *J. Exp. Med.* 202: 379-386 y Rooney *et al.*, (1998), *Blood* 92:1549-1555.

55 En el presente documento un sujeto puede ser un ser humano. En algunas realizaciones, un sujeto puede ser un mamífero no humano (por ejemplo, conejo, cobaya, rata, ratón u otro roedor (incluyendo cualquier animal del orden *Rodentia*), gato, perro, cerdo, ovejas, cabra, ganado (incluyendo vacas, por ejemplo, vacas lecheras, o cualquier animal del orden *Bos*), caballo (incluyendo cualquier animal del orden *Equidae*), burro, y primates no humanos).

60 Estimulación de linfocitos T

65 En la presente invención, las poblaciones de linfocitos T se generan y/o expanden. Los métodos generalmente comprenden etapas para estimular linfocitos T, dando como resultado su división celular y por lo tanto un aumento de su número.

Se puede generar una población de linfocitos T a partir de un único linfocito T mediante estimulación y consiguiente

división celular. Una población existente de linfocitos T puede expandirse por estimulación y la consiguiente división celular de las células de la población de linfocitos T.

5 Las APC que presentan un péptido del virus estimulan preferentemente linfocitos T específicos para el virus (es decir, linfocitos T que tienen un TCR capaz de reconocer el péptido viral presentado por la APC) y, por lo tanto la estimulación provoca la división celular y la proliferación de estas células sobre, por ejemplo, otros linfocitos T que no comprenden/expresan un TCR específico para el virus. por lo tanto la población de células al final de una estimulación se enriquece para linfocitos T específicos para el virus en comparación con la población de células antes de la estimulación; es decir, los linfocitos T específicos de virus están presentes con mayor frecuencia en la población de células después de la estimulación. De esta manera, una población de linfocitos T específica para el virus se expande/genera a partir de una población heterogénea de linfocitos T que tienen diferentes especificidades.

15 Los linfocitos T son estimulados para proliferar por división celular después de la activación. Como se ha descrito anteriormente, la activación de los linfocitos T se produce mediante la unión del complejo péptido MHC para el cual el TCR del linfocito T tiene una alta afinidad en el contexto de una señal coestimuladora positiva de APC. La activación induce a los linfocitos T a producir IL-2, que promueve la división celular. La activación de linfocitos T también regula al alza la expresión del receptor para IL-2, por lo que se promueve la proliferación de linfocitos T activados de manera autocrina.

20 Los métodos de la presente invención implican etapas de estimulación y reestimulación de linfocitos T usando APC que presentan un péptido del virus para el cual el linfocito T es específico. Las APC estimulantes están infectadas con, o comprenden o expresan un péptido de, el virus para el cual el linfocito T comprende un TCR específico, y presente péptido viral en el contexto de una molécula de MHC.

25 La estimulación promueve la división celular (es decir, hace que proliferen los linfocitos T), dando como resultado la generación y/o expansión de una población de linfocitos T específica para el virus.

30 Una etapa del método que comprende linfocitos T "estimulantes" y/o "reestimulantes" mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus se puede denominar "etapa de estimulación" en el presente documento. El cultivo de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus en el contexto de una etapa de estimulación de acuerdo con la invención se puede denominar "cultivo de estimulación" en el presente documento. Como quedará claro a partir de la presente divulgación, un cultivo de estimulación de una etapa de estimulación comprende células en cultivo en medios que comprenden medios de cultivo celular, y en muchos casos también que comprenden medios acondicionados.

35 La estimulación de linfocitos T de acuerdo con los métodos de la presente invención implica el cultivo de linfocitos T en presencia de las APC; es decir, cocultivo de los linfocitos T y las APC. El cocultivo se realiza normalmente *in vitro* o *ex vivo*.

40 En los métodos actuales, una población de linfocitos T específica de virus generalmente se genera o se expande a partir de, una población de PBMC. En consecuencia, En algunas realizaciones de los métodos de la presente invención los linfocitos T estimulados mediante cultivo en presencia de APC están presentes en el cultivo con otras PBMC tales como linfocitos B, linfocitos NK y/o monocitos. En algunas realizaciones, la población de linfocitos T puede generarse o expandirse a partir de, una población de leucocitos, y por lo tanto puede estar en cultivo con leucocitos que no sean linfocitos T, como linfocitos B, linfocitos NK, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, y/o basófilos.

50 La población de células a partir de la cual se genera o se expande la población de linfocitos T específica de virus, en el presente documento pueden denominarse "respondedores", y las APC que presentan un péptido del virus pueden denominarse "estimuladores" en el presente documento. En algunas realizaciones, Las etapas de estimulación de los métodos actuales proporcionan "respondedores" y "estimuladores" en proporciones particulares, denominado "relación de respondedor a estimulador" en el presente documento. Como quedará claro de lo anterior, en algunas realizaciones "respondedores" como se usa en el presente documento se refiere a una población de PBMC. En algunas realizaciones "respondedores" se refiere a una población de linfocitos T, o leucocitos.

55 En la etapa de estimulación inicial, los "respondedores" son la población de células que comprende los linfocitos T a partir de la cual se debe generar y/o expandir la población de linfocitos T específica de virus. Los "respondedores" de una estimulación inicial pueden ser, por ejemplo, una población de linfocitos T, una población de linfocitos, una población de leucocitos, o una población de PBMC. En realizaciones particulares, los "respondedores" de una estimulación inicial son una población de PBMC.

60 En las etapas de estimulación posteriores a la etapa de estimulación inicial (es decir, etapas de reestimulación de linfocitos T), los "respondedores" son las células al final de la etapa de estimulación anterior, por ejemplo, las células recogidas al final de la etapa de estimulación anterior. Los "respondedores" de una etapa de estimulación posterior incluirán células viables en cultivo al final de la etapa de estimulación anterior, incluyendo las células que han sido estimuladas para dividirse.

65

Por ejemplo, en un método que comprende las siguientes etapas:

- (i) estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus;
- (ii) recoger las células obtenidas en la etapa (i), y;
- (iii) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus, en donde al menos el 10 % de los medios en los que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus;

los "respondedores" para la estimulación de la etapa (iii) son las células recogidas en la etapa (ii).

Se apreciará que el "índice de respondedor al estimulador" se refiere al número relativo de células al comienzo de una etapa de estimulación dada, es decir, la proporción de células proporcionadas al cultivo al comienzo de la etapa de estimulación.

En algunas realizaciones los "respondedores" de una etapa de reestimulación pueden incluir células distintas de los linfocitos T; por ejemplo otras PBMC o leucocitos como se describe anteriormente. Por ejemplo, en realizaciones en donde los respondedores de una etapa de estimulación inicial de un método de acuerdo con la invención son PBMC, las células recogidas al final de dicha etapa de estimulación inicial pueden incluir PBMC o leucocitos distintos de los linfocitos T.

Los expertos en la materia conocen bien los métodos para expandir linfocitos T específicos de virus que comprenden múltiples etapas de estimulación. Las condiciones de cultivo típicas (es decir, medios de cultivo celular, aditivos, temperatura, atmósfera gaseosa), relaciones de respondedores a estimuladores, periodos de cultivo para las etapas de estimulación, etc. se puede determinar fácilmente por referencia, por ejemplo, a Bollard *et al.*, J Exp Med (2004), 200(12): 1623-1633 y Straathof *et al.*, Blood (2005), 105(5): 1898-1904.

El cocultivo de linfocitos T y APC en etapas de estimulación de acuerdo con la invención se realiza en medios de cultivo celular. Los medios de cultivo celular pueden ser cualquier medio en donde los linfocitos T y las APC de acuerdo con la invención se puedan mantener en cultivo *in vitro/ex vivo*. Los medios de cultivo adecuados para su uso en el cultivo de linfocitos son bien conocidos por los expertos, e incluyen, por ejemplo, medio AIM-V, medio Iscoves y medio RPMI-1640.

Como se usa en el presente documento, los "medios de cultivo celular" son distintos de los "medios acondicionados". Como quedará claro por la totalidad de la presente divulgación, un cultivo que comprende linfocitos T y APC de acuerdo con la presente invención puede establecerse usando sustancialmente solo medios de cultivo celular (por ejemplo, en una etapa de estimulación inicial), o puede comprender medios de cultivo celular y medios acondicionados (por ejemplo, en una etapa de estimulación posterior).

En algunas realizaciones, los medios de cultivo celular pueden comprender medio RPMI-1640 y/o medio de Click (también conocido como medio de aminoácidos de Eagle Ham) (EHAA). Las composiciones de estos medios son bien conocidas por la persona experta. La formulación del medio RPMI-1640 se describe, por ejemplo, en Moore *et al.*, JAMA (1967) 199:519-524, y la formulación de los medios de Click se describe en Click *et al.*, Cell Immunol (1972) 3:264-276. El medio RPMI-1640 se puede obtener por ejemplo, en ThermoFisher Scientific, y el medio de Click se puede obtener, por ejemplo, en Sigma-Aldrich (Catálogo N°. C5572).

En algunas realizaciones, los medios de cultivo celular comprenden medio RPMI-1640 y medio de Click. En algunas realizaciones los medios de cultivo celular comprenden (en volumen) 25-65 % de medio RPMI-1640 y 25-65 % de medio Click. En algunas realizaciones los medios de cultivo celular comprenden 30-60 % de medio RPMI-1640 y 30-60 % de medio Click. En algunas realizaciones los medios de cultivo celular comprenden 35-55 % de medio RPMI-1640 y 35-55 % de medio Click. En algunas realizaciones los medios de cultivo celular comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640 y 40-50 % de medio Click. En algunas realizaciones los medios de cultivo celular comprenden 45 % de medio RPMI-1640 y 45 % de medio Click.

En algunas realizaciones los medios de cultivo celular pueden comprender uno o más aditivos de medios de cultivo celular. Los aditivos de los medios de cultivo celular son bien conocidos por la persona experta, e incluyen antibióticos (por ejemplo, penicilina, estreptomycin), suero (por ejemplo, suero fetal bovino (FBS), albúmina de suero bovino (BSA)), L-glutamina, citoquinas/factores de crecimiento, etc.

En algunas realizaciones, los medios de cultivo celular comprenden (en volumen) 5-20 % de FBS, 7,5-15 % de FBS, o 10 % de FBS. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende L-glutamina 1-5 mM, L-glutamina 1,5-3 mM o glutamina 2 mM.

En algunas realizaciones, los medios de cultivo celular para una etapa de estimulación pueden comprender IL-2. En algunas realizaciones se puede añadir IL-2 (denominado en el presente documento "IL-2 añadido"). En algunas realizaciones la IL-2 puede ser exógena, es decir, IL-2 que no es producida por las células del cultivo. En algunas realizaciones la IL-2 puede ser IL-2 recombinante.

5 En algunas realizaciones, los medios de cultivo celular de una etapa de estimulación de acuerdo con la presente invención comprenden IL-2 añadida a una concentración final de 10-200 UI/ml, 15-175 UI/ml, 20-150 UI/ml, 30-125 UI/ml, o 40-100 UI/ml. La concentración final es la concentración en el volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación (incluyendo los medios de cultivo celular y cualquier medio acondicionado).

10 En algunas realizaciones particulares los medios de cultivo celular comprenden 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, 5-20 % de FBS, L-glutamina 1-5 mM, y IL-2 añadida a una concentración final de 10-200 UI/ml. En algunas realizaciones los medios de cultivo celular comprenden 42,5-47,5 % de medio RPMI-1640, 42,5-47,5 % de medio de Click, 7,5-15 % de FBS, L-glutamina 1,5-3 mM y IL-2 añadida a una concentración final de 20-150 UI/ml. En algunas realizaciones los medios de cultivo celular comprenden 45 % de medio RPMI-1640, 45 % de medio de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM y IL-2 añadida a una concentración final de 40-100 UI/ml.

15 Una etapa de estimulación de acuerdo con la presente invención implica normalmente el cocultivo de los linfocitos T y las APC durante un periodo de tiempo definido. De forma adecuada, el periodo de tiempo es al menos lo suficientemente largo para que las APC estimulen los linfocitos T para que se sometan a división celular. En algunas realizaciones el periodo de tiempo es lo suficientemente largo para la estimulación y al menos una división celular única de un linfocito T estimulado.

20 En algunas realizaciones, una etapa de estimulación de acuerdo con los métodos de la presente invención implica el cultivo de los linfocitos T y APC durante un periodo de al menos 1 hora, al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 48 horas, al menos 36 horas, al menos 72 horas, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, o al menos 14 días. En algunas realizaciones, una etapa de estimulación implica el cultivo de linfocitos T y APC
25 durante un periodo de no más de 20 días, no más de 14 días, no más de 13 días, no más de 12 días, no más de 11 días, no más de 10 días, no más de 9 días, no más de 8 días, no más de 7 días, no más de 6 días, no más de 5 días, no más de 4 días, o no más de 72 horas.

30 En algunas realizaciones, una etapa de estimulación de acuerdo con los métodos de la presente invención implica el cultivo de los linfocitos T y APC durante un periodo de uno de 24 horas a 20 días, 48 horas a 14 días y 3 a 12 días. En algunas realizaciones, una etapa de estimulación implica el cultivo de linfocitos T y APC durante un periodo de uno de 7 a 14 días, 8 días a 13 días, y 9 a 12 días. En algunas realizaciones, una etapa de estimulación implica el cultivo de linfocitos T y APC durante un periodo de 1 a 8 días, 2 días a 6 días, y 3 a 4 días.

35 Una etapa de estimulación generalmente finaliza separando las células en cultivo de los medios en donde se han cultivado. En algunas realizaciones, los métodos comprenden una etapa de recolectar las células al final de la etapa de estimulación (es decir, recolectar las células obtenidas al final de la etapa de estimulación anterior). El final de una etapa de estimulación está determinado por el periodo de cultivo para esa etapa; por ejemplo, una etapa del método que comprende estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido de un virus durante un periodo de 7 días se finaliza mediante la recolección de las células al final del periodo de cultivo de
40 7 días.

45 En algunas realizaciones de los métodos de acuerdo con la presente invención una etapa de estimulación termina diluyendo el cultivo, por ejemplo, mediante la adición de medios de cultivo celular. En dichas realizaciones, no es necesario que se acumulen células, y se puede establecer una etapa de reestimulación de acuerdo con la presente invención añadiendo medios de cultivo celular (y cualquier otro aditivo como se describe en el presente documento) en una cantidad apropiada para lograr los porcentajes/concentraciones deseadas de cultivo celular medios de comunicación, medios acondicionados (y cualquier aditivo) para la etapa de reestimulación.

50 Al final del periodo de cultivo de la etapa de estimulación, las células pueden recogerse y separarse del sobrenadante del cultivo celular. Para las células cultivadas en cultivo en suspensión (como linfocitos), las células pueden recogerse por centrifugación y el sobrenadante del cultivo celular puede separarse del sedimento celular. El sedimento celular puede volver a suspenderse en medios de cultivo celular, por ejemplo, para otra etapa de estimulación. En algunas realizaciones, las células pueden someterse a una etapa de lavado después de la recolección. Una etapa de lavado puede comprender resuspender el sedimento celular en tampón isotónico tal como
55 solución salina tamponada con fosfato (PBS), recolectar las células por centrifugación y desechar el sobrenadante.

60 Los métodos para generar y/o expandir una población de linfocitos T específica para un virus de acuerdo con la presente invención normalmente implican más de una sola etapa de estimulación. No existe un límite superior para el número de etapas de estimulación que se pueden realizar en un método de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones los métodos comprenden más de 2, 3, 4 o 5 etapas de estimulación. En algunas realizaciones, los métodos comprenden uno de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 etapas de estimulación.

65 Las etapas de estimulación en un método de acuerdo con la presente invención pueden ser diferentes entre sí.

La frecuencia de los linfocitos T específicos de virus a expandir puede ser muy baja en la población de respuesta

5 inicial (por ejemplo, la muestra de PBMC obtenida de un sujeto), y en las etapas posteriores la frecuencia de linfocitos T específicos de virus en la población de respuesta es mayor como resultado de la estimulación o estimulaciones anterior(es). En consecuencia, en algunas realizaciones los métodos proporcionan una relación de respondedor a estimulador más alta para una etapa de estimulación inicial que para etapas posteriores (es decir, reestimulación).

10 En algunas realizaciones, la proporción de respondedores a estimuladores para una etapa de estimulación inicial está en el intervalo de uno de 10:1 a 80:1, 15:1 a 70:1, 20:1 a 65:1, 25:1 a 60:1, 30:1 a 50:1, 35:1 a 45:1 o 40:1. En algunas realizaciones, la proporción de respondedores a estimuladores para una etapa de reestimulación está en el intervalo de 1:1 a 10:1, 1.5:1 a 8:1, 2:1 a 7:1, 2.5:1 a 6:1, 3:1 a 5:1, 3.5:1 a 4.5:1, o 4:1.

15 Una etapa de estimulación inicial (es decir, la primera etapa de estimulación del método) normalmente implica el cultivo de los linfocitos T y APC durante un periodo de tiempo que es un periodo más largo que el periodo de cultivo para una etapa de estimulación posterior. El periodo de tiempo más largo permite un aumento apreciable en el número de linfocitos T específicos de virus de su frecuencia generalmente baja en la población de respuesta de la estimulación inicial.

20 En algunas realizaciones, una etapa de estimulación inicial implica el cultivo de los linfocitos T y APC durante un periodo de uno de 7 a 14 días, 8 días a 13 días, y 9 a 12 días. En algunas realizaciones, una etapa de estimulación posterior implica el cultivo de linfocitos T y APC durante un periodo de 1 a 8 días, 2 días a 5 días, y 3 a 4 días.

En algunas realizaciones, el cultivo de una etapa de estimulación inicial puede no incluir IL-2 añadida, mientras que el cultivo de las siguientes etapas de estimulación puede incluir IL-2 añadida.

25 En algunas realizaciones, los métodos comprenden una etapa de estimulación inicial seguida de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 etapas de estimulación posteriores. En algunas realizaciones, cada una de las etapas de estimulación posteriores implica el cultivo de los linfocitos T y APC durante el mismo periodo de tiempo o similar. En algunas realizaciones, cada una de las etapas de estimulación posteriores implica el cultivo de los linfocitos T y APC en la misma proporción o similar de respondedores a estimuladores. En algunas realizaciones, el cultivo de cada una de las etapas de estimulación posteriores comprende IL-2 añadida a la misma concentración final o similar.

30 De manera conveniente, los cultivos de células de acuerdo con la presente divulgación se mantienen a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5 % de CO₂. Los cultivos se pueden realizar en cualquier recipiente adecuado para el volumen del cultivo, por ejemplo, en pocillos de una placa de cultivo celular, matraces de cultivo celular, un biorreactor, etc. Las células de cultivos celulares de acuerdo con la presente invención pueden establecerse y/o mantenerse a cualquier densidad adecuada, como puede determinar fácilmente la persona experta. Por ejemplo, los cultivos pueden establecerse a una densidad inicial de ~0,5 x 10⁶ a ~5 x 10⁶ células/ml del cultivo (por ejemplo, ~1 x 10⁶ células/ml).

40 Las células pueden cultivarse en cualquier recipiente de cultivo celular adecuado. En algunas realizaciones de los métodos de acuerdo con los diversos aspectos de la presente invención, las células se cultivan en un biorreactor. En algunas realizaciones, las células se cultivan en un biorreactor descrito en Somerville y Dudley, *Oncoimmunology* (2012) 1(8):1435-1437. En algunas realizaciones las células se cultivan en un recipiente de cultivo celular GRex, por ejemplo, un matraz GRex o un biorreactor GRex 100.

45 Medios acondicionados

50 La presente invención implica el cultivo de células en medios acondicionados. "Medios acondicionados" se refiere a medios que se han obtenido mediante cultivo de células en medios de cultivo celular. Los medios acondicionados contienen factores (por ejemplo, citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, etc.) secretados/liberados de las células cultivadas. Los medios acondicionados se producen cultivando células en un medio de cultivo durante un tiempo suficiente para acondicionar el medio, y luego recogiendo el medio acondicionado.

55 Los cultivos de etapas de estimulación de acuerdo con la invención pueden comprender una mezcla de un medio de cultivo celular y un medio acondicionado. Esto es, los medios en que se establecen y cultivan las células de un cultivo de estimulación (por ejemplo, de una etapa de estimulación) pueden comprender tanto medios de cultivo celular como medios acondicionados. El uso de una mezcla de un medio acondicionado y un medio nuevo puede proporcionar una mezcla de nutrientes más compleja que es beneficiosa para las células en cultivo.

60 Se apreciará que la composición de los medios acondicionados dependerá de las células, el periodo de tiempo, las condiciones de cultivo, el uso de cualquier aditivo y la composición de los medios de cultivo celular usados para el cultivo del que se obtienen los medios acondicionados.

65 En la presente invención, los medios acondicionados se obtienen de un cultivo de estimulación que comprende linfocitos T y APC.

En algunas realizaciones los medios de cultivo celular y los medios acondicionados de un cultivo de estimulación de acuerdo con los presentes métodos pueden ser los mismos excepto que los medios acondicionados hayan sido acondicionados.

5 En algunas realizaciones de acuerdo con los métodos de la presente invención, los medios acondicionados pueden obtenerse del cultivo de una etapa de estimulación de acuerdo con cualquier realización descrita en el presente documento.

10 En algunas realizaciones, los medios acondicionados se recogen en el punto final de una etapa de estimulación. De manera conveniente, los medios acondicionados se pueden recolectar en el punto final de una etapa de estimulación al momento de recolectar las células. Por ejemplo, los medios acondicionados de acuerdo con la invención pueden obtenerse del sobrenadante obtenido por centrifugación para recoger células al final de una etapa de estimulación como se describe en el presente documento.

15 En algunas realizaciones, los medios acondicionados incluidos en el cultivo de una etapa de estimulación (es decir, un cultivo de estimulación) de acuerdo con la invención se obtienen del cultivo de una etapa de estimulación como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los medios acondicionados no se obtienen del cultivo de una etapa de estimulación inicial (es decir, la primera etapa de estimulación de un método de acuerdo con la invención).

20 El experto puede determinar un periodo de cultivo apropiado para acondicionar un medio, basándose en métodos conocidos. normalmente, se acondicionará un medio entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 8 días, como entre 1 día y 8 días, 2 días a 5 días, o 3 a 4 días.

25 En realizaciones particulares, los medios acondicionados de acuerdo con la presente invención se obtienen de:

(1) Un cultivo de estimulación de linfocitos T específicos de virus en presencia de APC que presentan un péptido del virus para el cual los linfocitos T son específicos;

30 (2) Un cultivo de estimulación de acuerdo con (1), después de un periodo de cultivo de 1 a 8 días, 2 días a 6 días, y 3 a 4 días;

(3) Un cultivo de estimulación de acuerdo con (1) o (2), en una proporción de respuesta:estimulador de 1:1 a 10:1, 1,5:1 a 8:1, 2:1 a 7:1, 2,5:1 a 6:1, 3:1 a 5:1, 3,5:1 a 4,5:1, o 4:1;

35 (4) Un cultivo de estimulación de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), en donde el medio de cultivo celular usado para el cultivo de estimulación comprende 30-60 % de medio RPMI-1640 y/o 30-60 % de medio de Click y/o FBS al 5-20 % y/o L-glutamina 1-5 mM;

(5) Un cultivo de estimulación de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (4), que comprende IL-2 añadida a una concentración final de 10-200 UI/ml, 15-175 UI/ml, 20-150 UI/ml, 30-125 UI/ml, o 40-100 UI/ml;

40 (6) Un cultivo de estimulación de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (5), que comprende adicionalmente al menos 10 % de medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (5);

(7) Un cultivo de estimulación de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6), en donde las APC son LCL, por ejemplo, LCL transformadas por EBV.

45 En algunas realizaciones, los medios acondicionados incluidos en el cultivo de una etapa de estimulación dado pueden obtenerse del cultivo de otra, etapa de estimulación diferente del mismo método. Por ejemplo, los medios acondicionados incluidos en el cultivo de una tercera etapa de estimulación de un método de acuerdo con la invención pueden obtenerse del cultivo de la segunda etapa de estimulación.

50 En algunas realizaciones, los medios acondicionados incluidos en el cultivo de una etapa de estimulación pueden obtenerse del cultivo de la etapa de estimulación anterior del método. Por ejemplo, los medios acondicionados incluidos en el cultivo de una tercera etapa de estimulación pueden obtenerse del cultivo de la segunda etapa de estimulación, y los medios acondicionados incluidos en el cultivo de una cuarta etapa de estimulación pueden obtenerse del cultivo de la tercera etapa de estimulación, etc.

55 En realizaciones de los métodos de acuerdo con la presente invención, no todas las etapas de estimulación comprenden el cultivo en los medios, incluidos los medios acondicionados. Por ejemplo, en algunas realizaciones el cultivo de la etapa de estimulación inicial de acuerdo con los métodos no incluye medios acondicionados.

60 Un cultivo de una etapa de estimulación de acuerdo con la presente divulgación que comprende medios acondicionados puede contener medios acondicionados en una cantidad (en volumen) de uno de al menos 2 %, al menos un 5 %, al menos 7,5%, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90%, o al menos 95% del volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación. El volumen restante puede estar compuesto por medios de cultivo celular como se describe en el presente documento, incluyendo cualquier aditivo a los mismos. En algunas realizaciones, los medios acondicionados pueden comprender al menos el 10 % del volumen total de medios en el

cultivo de la etapa de estimulación.

5 Aunque los medios acondicionados son ricos en factores de crecimiento y citoquinas normalmente comprenden una concentración más baja de, por ejemplo, aminoácidos y glucosa en comparación con los medios de cultivo celular comparables que no han sido acondicionados, debido, por ejemplo, al consumo de las células cultivadas en el medio. Los medios acondicionados también pueden comprender productos de desecho de las células usadas para
10 acondicionar los medios. Dichos factores pueden tener un impacto negativo en el crecimiento y la división celular, por lo que puede ser importante que no el 100 % de los medios en un cultivo de estimulación de una etapa de estimulación de acuerdo con la presente divulgación sean medios acondicionados. En algunas realizaciones, un cultivo de una etapa de estimulación que comprende medios acondicionados puede contener medios
15 acondicionados en una cantidad (en volumen) de uno de menos del 100 %, menos del 95 %, menos del 90 %, menos del 85 %, menos del 80 %, menos del 75 %, menos del 70 %, menos del 65 %, menos del 60 %, menos del 55 %, menos del 50 %, menos del 45 %, menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 %, menos del 25 %, menos del 20%, o menos de 15 % del volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación.

15 En algunas realizaciones, los medios acondicionados pueden comprender hasta el 30 %, hasta 25 %, hasta 20 % o hasta 15 % del volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación.

20 En algunas realizaciones, los medios acondicionados pueden comprender uno de 5 a 70 %, 7,5 a 70 %, 10 a 70 %, 10 a 65 %, 10 a 60 %, 12,5 a 55 %, 15 a 50 %, 15 a 45 %, 15 a 40 %, 17,5 % a 45 %, del 20-40 %, 20-35 %, o 20-30 % del volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación. En algunas realizaciones, los medios acondicionados pueden comprender 20-30 % del volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación. En algunas realizaciones, los medios acondicionados pueden comprender del 10 al 25 %, preferentemente
25 aproximadamente 15 % del volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación.

25 En algunas realizaciones, los medios acondicionados pueden comprender uno de 5 a 30 %, 5 a 27,5 %, 5 a 25 %, 5 a 22,5 %, 5 a 20 %, o 5 a 17,5 % del volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación. En algunas realizaciones, los medios acondicionados pueden comprender uno de 7,5 a 30 %, 10 a 30 % o 12,5 a 30 % del volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación.

30 En algunas realizaciones, los medios acondicionados pueden comprender uno de 5 a 30 %, 10 a 25 %, 10 a 20 %, 12,5 a 17,5 % o aproximadamente 15 % del volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación.

35 En algunas realizaciones, los medios acondicionados pueden comprender uno de aproximadamente 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % o 30 % del volumen total de medios en el cultivo de la etapa de estimulación.

40 Los medios de cultivo pueden ser una formulación 1x o una formulación concentrada, por ejemplo, una formulación de medio concentrada de x2 a x250. En una formulación 1x cada ingrediente en el medio está en la concentración prevista para el cultivo celular. En una formulación concentrada, uno o más de los ingredientes están presentes a una concentración más alta que la prevista para el cultivo celular. Los medios de cultivo concentrados son bien conocidos en la técnica. Los medios de cultivo se pueden concentrar usando métodos conocidos, por ejemplo, la precipitación salina o filtración selectiva. Un medio concentrado se puede diluir para su uso con agua (preferentemente, desionizada y destilada) o cualquier solución apropiada, por ejemplo, una solución salina acuosa,
45 un tampón acuoso o medio de cultivo.

50 Se apreciará que los porcentajes indicados se hacen con referencia a una formulación 1x de medios acondicionados. El experto entiende que un cultivo que comprende el 10 % de una formulación 1x de medios acondicionados es equivalente a un cultivo que comprende el 1 % de una formulación concentrada 10x de medios acondicionados.

55 En algunas realizaciones, los medios acondicionados se pueden recolectar del cultivo de una etapa de estimulación y almacenar, por ejemplo a -80 °C. Los medios acondicionados almacenados pueden descongelarse y usarse en un método de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones los medios acondicionados pueden tratarse para eliminar células o restos, por ejemplo por filtración.

Realizaciones a modo de ejemplo específicas de los métodos

60 De acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan varias realizaciones a modo de ejemplo específicas de los métodos. Las siguientes realizaciones específicas son para fines puramente ilustrativos, para mostrar cómo se pueden combinar las diversas características descritas anteriormente y no pretenden de ninguna manera limitar la presente invención.

65 Un método para generar o expandir, o un método para acelerar la tasa de expansión de, una población de linfocitos T específica de EBV (por ejemplo, CTL), que comprende linfocitos T estimulantes (por ejemplo, dentro de una población de PBMC) mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV (por ejemplo, LCL irradiadas,

transformadas con EBV), en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 (por ejemplo, 4:1) durante un periodo de 1 a 8 (por ejemplo, 3 a 4) días, en medios que comprenden:

- 5 (a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % (por ejemplo, 45 %) medio RPMI-1640, 40-50 % (por ejemplo, 45 %) Medio de Click, 5-20 % (por ejemplo, 10 %) FBS y 1-5 mM (por ejemplo, 2 mM) L-glutamina, (b) al menos 10 % (por ejemplo, 10 % a 70 %) medios acondicionados obtenidos por un método que comprende: estimular linfocitos T (por ejemplo, dentro de una población de PBMC) mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV (por ejemplo, LCL irradiadas, transformadas con EBV), en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 (por ejemplo, 4:1) en medios de cultivo celular que comprenden 40-50 %
10 (por ejemplo, 45 %) medio RPMI-1640, 40-50 % (por ejemplo, 45 %) Medio de Click, 5-20 % (por ejemplo, 10 %) FBS y 1-5 mM (por ejemplo, 2 mM) L-glutamina, y añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 (por ejemplo, 40-100) IU/ml, por un periodo de 1 a 8 (por ejemplo, 3 a 4) días, y
(c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 (por ejemplo, 40-100) IU/ml.

- 15 Un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica de EBV (por ejemplo, CTL), que comprende:

- (i) estimular los linfocitos T (por ejemplo, dentro de una población de PBMC) mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV (por ejemplo, LCL irradiadas, transformadas con EBV) en una relación de respondedor a estimulador de 10:1 a 80:1 (por ejemplo 40:1) en medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % (por ejemplo, 45 %) medio RPMI-1640, 40-50 % (por ejemplo, 45 %) Medio de Click, 5-20 % (por ejemplo, 10 %) FBS y 1-5 mM (por ejemplo, 2 mM) L-glutamina durante un periodo de 7 a 14 (por ejemplo, 9 a 12) días;
20 (ii) recoger las células obtenidas en la etapa (i);
(iii) reestimar los linfocitos T mediante el cultivo de células recogidas en la etapa (ii) en presencia de LCL transformadas con EBV (por ejemplo, LCL irradiadas, transformadas con EBV) en una relación de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 (por ejemplo, 4:1) en medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % (por ejemplo, 45 %) medio RPMI-1640, 40-50 % (por ejemplo, 45 %) Medio de Click, 5-20 % (por ejemplo, 10 %) FBS y 1-5 mM (por ejemplo, 2 mM) L-glutamina, y añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 (por ejemplo, 40-100) IU/ml, por un periodo de 1 a 8 (por ejemplo, 3 a 4) días;
25 (iv) recoger las células obtenidas en la etapa (iii), y;
(v) reestimar los linfocitos T mediante el cultivo de células recogidas en la etapa (iv) en presencia de LCL transformadas con EBV (por ejemplo, LCL irradiadas, transformadas con EBV) en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 (por ejemplo, 4:1) durante un periodo de 1 a 8 (por ejemplo, 3 a 4) días en medios que comprenden: (a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % (por ejemplo, 45 %) medio RPMI-1640, 40-50 % (por ejemplo, 45 %) Medio de Click, 5-20 % (por ejemplo, 10 %) FBS y 1-5 mM (por ejemplo, 2 mM) L-glutamina, (b) al menos 10 % (por ejemplo, 10 % a 70%) medios acondicionados obtenidos en el punto final de la etapa (iii) y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 (por ejemplo, 40-100) IU/ml.
30
35

En algunas realizaciones, el método además comprende:

- 40 (vi) recoger las células obtenidas en la etapa (v), y;
(vii) reestimar los linfocitos T mediante el cultivo de células recogidas en la etapa (vi) en presencia de LCL transformadas con EBV (por ejemplo, LCL irradiadas, transformadas con EBV) en una relación de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 (por ejemplo, 4:1) durante un periodo de 1 a 8 (por ejemplo, 3 a 4) días en medios que comprenden: (a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % (por ejemplo, 45 %) medio RPMI-1640, 40-50 % (por ejemplo, 45 %) Medio de Click, 5-20 % (por ejemplo, 10 %) FBS y 1-5 mM (por ejemplo, 2 mM) L-glutamina, (b) al menos 10 % (por ejemplo, 10 % a 70 %) medios acondicionados obtenidos en el punto final de la etapa (v) y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 (por ejemplo, 40-100) IU/ml.
45

- 50 En algunas realizaciones, el método comprende pasos adicionales de recolección de células y reestimulación de los linfocitos T mediante el cultivo de las células recolectadas en presencia de LCL transformadas con EBV (por ejemplo, LCL irradiadas, transformadas con EBV) en una relación de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 (por ejemplo, 4:1) durante un periodo de 1 a 8 (por ejemplo, 3 a 4) días en medios que comprenden: (a) medios de cultivo celular que comprenden 40-50 % (por ejemplo, 45 %) medio RPMI-1640, 40-50 % (por ejemplo, 45 %) Medio de Click, 5-20 % (por ejemplo, 10 %) FBS y 1-5 mM (por ejemplo, 2 mM) L-glutamina, (b) al menos 10 % (por ejemplo, 10 % a 70 %) medios acondicionados obtenidos en el punto final de la etapa de estimulación anterior, y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 (por ejemplo, 40-100) IU/ml.
55

Tasas de expansión

- 60 Los métodos actuales logran una tasa de expansión mejorada para poblaciones de linfocitos T específicos de virus en comparación con los métodos de la técnica anterior.

- 65 La tasa de expansión para una población de linfocitos T puede analizarse mediante métodos bien conocidos por los expertos. Los métodos incluyen medir el número de linfocitos T en uno o más puntos de tiempo. Por ejemplo, el número de linfocitos T puede determinarse después de realizar un método de acuerdo con la invención y

compararse con el número de linfocitos T al comienzo del método; entonces las veces de expansión del número de linfocitos T se pueden calcular.

5 Las tasas de expansión también se pueden determinar analizando la división celular por linfocitos T durante un periodo de tiempo. Se puede analizar la división celular para una población dada de linfocitos T, por ejemplo, mediante análisis *in vitro* de incorporación de ³H-timidina o mediante ensayo de dilución CFSE, por ejemplo, como se describe en Fulcher y Wong, Immunol Cell Biol (1999) 77(6): 559-564.

10 La mejora de la velocidad de expansión lograda por los métodos de acuerdo con la presente invención puede determinarse realizando un método de acuerdo con la presente divulgación, y comparando la expansión de los linfocitos T en ese método con un método comparable, método de control que carece de un cultivo de estimulación en presencia de medios acondicionados.

15 Por ejemplo, la tasa de expansión se puede comparar entre dos métodos: (i) un método de acuerdo con la presente divulgación, que comprende estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus, en donde al menos el 10 % de los medios en donde se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación que comprende linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus; y (ii) un método de control comparable, que es lo mismo excepto que los medios de cultivo celular se usan en lugar de los medios acondicionados.

20 En algunas realizaciones, la tasa de expansión para una población de linfocitos T en un método de acuerdo con la presente invención es una de al menos 1,001 veces, 1,002 veces, 1,003 veces, 1,004 veces, 1,005 veces, 1,006 veces, 1,007 veces, 1,008 veces, 1,009 veces, 1,01 veces, 1,02 veces, 1,03 veces, 1,04 veces, 1,05 veces, 1,06 veces, 1,07 veces, 1,08 veces, 1,09 veces, 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, o 2 veces la tasa de expansión en un método de control comparable en donde se usan medios de cultivo celular en lugar de los medios acondicionados.

25 La tasa de expansión puede ser de la población de linfocitos T específica de virus o de la población total de linfocitos T.

30 Propiedades de las células expandidas

Ventajosamente, los linfocitos T específicos de virus generados/expandidos de acuerdo con el método de la presente invención conservan las mismas propiedades funcionales que los linfocitos T específicos de virus generados/expandidos de acuerdo con los métodos de la técnica anterior. Esto es, la velocidad de expansión acelerada no influye negativamente en las propiedades funcionales de los linfocitos T expandidos.

35 Por ejemplo, en realizaciones en donde los métodos generan/expanden una población de CTL específicos de virus, los CTL muestran una citotoxicidad similar a las células infectadas o que comprenden/expresan un péptido del virus como los CTL específicos de virus expandidos de acuerdo con métodos que carecen de cultivo de estimulación en presencia de medios acondicionados.

40 La citotoxicidad de los CTL expandidos puede analizarse, por ejemplo, cultivando la población de linfocitos T expandida con APC que presentan un péptido del virus para el cual el linfocito T es específica en diferentes proporciones de efector (es decir, linfocitos T) a diana (es decir APC), y medir la lisis específica de las APC. Por ejemplo, La citotoxicidad de una población CTL específica de EBV se puede analizar midiendo la lisis específica de células LCL transformadas con EBV a diferentes relaciones efector a diana.

45 Aplicaciones terapéuticas y profilácticas

50 Los métodos actuales encuentran aplicación en métodos de tratamiento médico. Se puede proporcionar tratamiento a sujetos que tienen una enfermedad o afección que necesitan tratamiento.

55 En particular, se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno (por ejemplo, un cáncer) que comprenden un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus, o un método para acelerar la velocidad de expansión de una población de linfocitos T específica para virus, como se describe en el presente documento.

60 Los métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender transferencia adoptiva de linfocitos T.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende:

- 65 (1) aislar linfocitos T de un sujeto;
 (2) generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus como se describe en el presente

documento, y;

(3) administrar la población generada o expandida de linfocitos T a un sujeto.

5 En algunas realizaciones, el sujeto del que se obtienen los linfocitos T en la etapa (1) del método es el mismo sujeto que la población de linfocitos T generada o expandida de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento se administran en la etapa (3) del método (es decir, la transferencia adoptiva es de linfocitos T autólogos). En algunas realizaciones, el sujeto del que se obtienen los linfocitos T en la etapa (1) del método es un sujeto diferente al sujeto al que se administra la población de linfocitos T generada o expandida de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento en la etapa (3) del método (es decir, la transferencia adoptiva es de linfocitos T alogénicos).

Se apreciará que los linfocitos T aislados del sujeto de acuerdo con la etapa (1) anterior pueden estar dentro de una población de PBMC.

15 En algunas realizaciones, el método puede comprender una o más de las siguientes etapas: tomar una muestra de sangre de un sujeto; aislar PBMC de la muestra de sangre; aislar linfocitos T de la muestra de sangre; generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento; modificar los linfocitos T, por ejemplo, para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de linfocitos T (TCR); recolectar la población generada/expandida de linfocitos T específicos de virus; mezclar la población generada/expandida de linfocitos T específicos de virus con un adyuvante, diluyente o vehículo; administrar la población generada/expandida de linfocitos T específicos de virus a un sujeto.

25 Los métodos pueden comprender la modificación o el tratamiento de los linfocitos T de alguna manera. Por ejemplo, el linfocito T puede modificarse *in vitro* o *ex vivo* para expresar o comprender un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de linfocitos T (TCR). Los linfocitos T pueden modificarse de acuerdo con métodos bien conocidos por la persona experta. La modificación puede comprender la transferencia de ácido nucleico para la expresión permanente o transitoria del ácido nucleico transferido. Se puede usar cualquier plataforma de ingeniería genética adecuada para dicha modificación. Los métodos adecuados incluyen el uso de plataformas de ingeniería genética tales como vectores gamma-retrovirales, vectores lentivirales, vectores de adenovirus, transfección de ADN, administración de genes basada en transposones y transfección de ARN, por ejemplo como se describe en Maus *et al.*, *Annu Rev Immunol* (2014) 32:189-225.

35 El tratamiento puede estar dirigido a la prevención de una enfermedad/trastorno, y como tal los linfocitos T específicos de virus generados/expandidos de acuerdo con el método de la presente divulgación pueden emplearse profilácticamente contra el desarrollo de un estado de enfermedad. Esto puede tener lugar antes del inicio de los síntomas del estado de la enfermedad, y/o puede administrarse a sujetos considerados con mayor riesgo de enfermedad o trastorno.

40 Mediante la administración de una población de linfocitos T de acuerdo con la presente divulgación, o la administración de una composición farmacéutica que comprende una población de linfocitos T de acuerdo con la presente divulgación, la enfermedad o trastorno se trata o previene.

45 La enfermedad o afección puede ser una causada o exacerbada por la infección con un virus para el cual los linfocitos T generados/expandidos de acuerdo con el método de la presente invención son específicos. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección puede ser una causada o exacerbada por la infección con un virus descrito en el presente documento.

50 En particular, la enfermedad o afección puede ser causada o exacerbada por el virus de Epstein-Barr (VEB), virus de la gripe, virus del sarampión, virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus del herpes simple (VHS) o virus del papiloma humano (VPH).

55 Los linfocitos T específicos de virus generados/expandidos de acuerdo con el método de la presente invención son útiles en métodos para el tratamiento o prevención del cáncer. En consecuencia, en algunas realizaciones, el método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno es para tratar o prevenir un cáncer.

60 Los métodos de tratamiento médico pueden implicar el tratamiento del cáncer mediante un método para mejorar, tratar o prevenir un tumor maligno en un sujeto humano en donde las etapas del método ayudan o estimulan al sistema inmunitario a erradicar las células cancerosas. Dichos métodos pueden incluir la administración de linfocitos T específicos de virus generados/expandidos de acuerdo con el método de la presente invención que invocan una respuesta inmune activa (o logran una respuesta pasiva) para destruir células cancerosas. Los métodos de tratamiento pueden incluir opcionalmente la administración conjunta de adyuvantes biológicos (por ejemplo, interleucinas, citoquinas, Bacilo Comette-Guerin, monofosforil lípido A, etc.) en combinación con terapias convencionales para el tratamiento del cáncer como quimioterapia, radiación, o cirugía. Los métodos de tratamiento pueden implicar la administración de linfocitos T específicos de virus generados/expandidos de acuerdo con el método de la presente invención como una vacuna que funciona activando el sistema inmune para prevenir o

destruir el crecimiento de células cancerosas. Los métodos de tratamiento médico pueden involucrar inmunoterapias *in vivo*, *ex vivo*, y adoptivas, incluyendo las que usan células autólogas y/o heterólogas o líneas celulares inmortalizadas.

5 Un cáncer puede ser cualquier proliferación celular no deseada (o cualquier enfermedad que se manifieste por proliferación celular no deseada), neoplasia o tumor o mayor riesgo o predisposición a la proliferación celular no deseada, neoplasia o tumor. El cáncer puede ser benigno o maligno y puede ser primario o secundario (metastásico). Una neoplasia o tumor puede ser cualquier crecimiento o proliferación anormal de células y puede estar ubicado en cualquier tejido. Los ejemplos de tejidos incluyen la glándula suprarrenal, médula suprarrenal, ano, apéndice, vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, ciego, cerebelo del sistema nervioso central (incluyendo o excluyendo el cerebro), cuello del útero, colon, duodeno, endometrio, células epiteliales (por ejemplo, epitelios renales), vesícula biliar, esófago, células gliales, corazón, el íleon, el yeyuno, el riñón, glándula lagrimal, laringe, hígado, pulmón, linfa, ganglio linfático, linfoblastos, maxilar superior, mediastino, mesenterio, miometrio, nasofaringe, el omento, cavidad oral, ovario, páncreas, glándula parótida, sistema nervioso periférico, peritoneo, pleura, próstata, glándulas salivales, colon sigmoideo, piel, el intestino delgado, tejidos blandos, el bazo, estómago, testículos, timo, glándula tiroides, lengua, la amígdala, la tráquea, útero, vulva, glóbulos blancos sanguíneos.

20 Los tumores a tratar pueden ser tumores del sistema nervioso o no nervioso. Los tumores del sistema nervioso pueden originarse en el sistema nervioso central o periférico, por ejemplo, glioma, meduloblastoma, meningioma, neurofibroma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma, astrocitoma y oligodendroglioma. Los cánceres/tumores del sistema no nervioso pueden originarse en cualquier otro tejido no nervioso, los ejemplos incluyen melanoma, mesotelioma, linfoma, mieloma, leucemia, linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma cutáneo de linfocitos T (CTCL), leucemia linfocítica crónica (LLC), hepatoma, carcinoma epidermoide, carcinoma de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma tímico, NSCLC, cáncer hematológico y sarcoma.

30 En particular, se contempla tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer orofaríngeo (OPC), cáncer cervical (CC), cáncer gástrico/estomacal o cáncer de pulmón.

En algunas realizaciones el cáncer es un cáncer positivo para EBV o VPH. En algunas realizaciones, el cáncer es NPC positivo para EBV. En algunas realizaciones, el cáncer es OPC positivo para VPH o CC positivo para VPH.

35 La administración de linfocitos T específicos de virus generados/expandidos de acuerdo con el método de la presente invención se realiza preferentemente en una "cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz", que es suficiente para mostrar un beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y el tiempo de administración, dependerá de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., pertenecen a la responsabilidad de los médicos de familia y otros facultativos, y normalmente se tiene en cuenta el trastorno a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Se pueden encontrar ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

45 La presente descripción proporciona poblaciones de linfocitos T generadas o expandidas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. En consecuencia, se desvela una población de linfocitos T específica para un virus, en donde la población de linfocitos T se obtiene mediante, es obtenible por, o es el producto de, un método de acuerdo con la presente invención.

50 También se desvelan usos de las poblaciones de linfocitos T en métodos para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno como se describe en el presente documento.

55 Esto es, La presente descripción proporciona una población de linfocitos T específica para un virus para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno, en donde la población de linfocitos T se obtiene mediante, es obtenible por, o es el producto de, un método de acuerdo con la presente invención.

También se desvela un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar una población de linfocitos T específica para un virus a un sujeto, en donde la población de linfocitos T se obtiene mediante, es obtenible por, o es el producto de, un método de acuerdo con la presente invención.

60 También se desvela el uso de una población de linfocitos T o composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación en la fabricación de un medicamento o vacuna para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno, en donde la población de linfocitos T se obtiene mediante, es obtenible por, o es el producto de, un método de acuerdo con la presente invención.

65 Composiciones y medicamentos farmacéuticamente útiles

Los linfocitos T específicos de virus generados/expandidos de acuerdo con el método de la presente invención pueden formularse para uso clínico y pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente, excipiente o adyuvante.

5 De acuerdo con la presente divulgación también se proporcionan métodos para la producción de composiciones farmacéuticamente útiles que comprenden linfocitos T específicos de virus generados/expandidos de acuerdo con el método de la presente invención, dichos métodos de producción pueden comprender una o más etapas seleccionadas entre: generar/expandir una población de linfocitos T específica de virus de acuerdo con los métodos de la presente invención; y/o mezclar linfocitos T específicos de virus generados/expandidos de acuerdo con los métodos de la presente invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable, adyuvante, excipiente o diluyente.

10 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar una composición farmacéutica, medicamento o vacuna, el método comprendiendo generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus de acuerdo con los métodos de la presente invención, y mezclar las células obtenidas con un vehículo farmacéuticamente aceptable, adyuvante, diluyente o excipiente.

15 La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una población de linfocitos T de acuerdo con la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, adyuvante, excipiente o diluyente. La población de linfocitos T se puede obtener mediante, es obtenible por, o el producto de, un método de acuerdo con la presente invención.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación para usar en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno.

25 También se desvela un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación a un sujeto.

También se desvelar el uso de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación en la fabricación de un medicamento o vacuna para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno.

30 Sujetos

El sujeto a tratar puede ser cualquier animal o ser humano. El sujeto es preferentemente mamífero, más preferentemente humano. El sujeto puede ser un mamífero no humano, pero es más preferentemente humano. El sujeto puede ser hombre o mujer. El sujeto puede ser un paciente.

Un sujeto puede haber sido diagnosticado con una enfermedad o afección que requiere tratamiento, puede sospecharse que tiene una enfermedad o afección de este tipo, o puede estar en riesgo de desarrollar dicha enfermedad o afección.

40 Kits

En un aspecto de la presente divulgación se proporciona un kit de partes. El kit de partes comprende una población de linfocitos T de acuerdo con la presente divulgación, o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente descripción.

En algunas realizaciones, el kit puede incluir instrucciones para usar la población de linfocitos T o composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno como se describe en el presente documento.

50 En algunas realizaciones, un kit puede comprender un recipiente que comprende una cantidad de linfocitos T obtenidas por un método de la presente invención formulado para la administración a un sujeto (por ejemplo, por mezcla con un vehículo adecuado, excipiente, diluyente o adyuvante) preferentemente por infusión, más preferentemente para administración por infusión en un método de inmunoterapia celular adoptiva autóloga. El kit puede mantenerse a una temperatura predeterminada, por ejemplo, menos de aproximadamente 4 °C, menos de aproximadamente -2 °C o menos de aproximadamente -50 °C. El kit puede comprender además instrucciones para el almacenamiento y/o transporte del kit y/o para la administración de los linfocitos T.

La invención incluye la combinación de los aspectos y características preferentes descritas excepto cuando tal combinación es claramente inadmisibles o se evita expresamente.

60 Los encabezados de sección usados en el presente documento tienen fines organizativos solamente, y no deben considerarse como limitantes de la materia objeto descrita.

Ahora se ilustrarán aspectos y realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Otros aspectos y realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

65

A lo largo de la presente memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones que siguen, a no ser que el contexto requiera lo contrario, el término "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" se entenderá que implica la inclusión de un número entero o etapa o de un grupo de números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de cualquiera de otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Debe destacarse que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el" incluye referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Los intervalos pueden expresarse en el presente documento como "aproximadamente" un valor particular y/o "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, por el uso del antecedente "acerca de" se entenderá que el valor particular constituye otra realización.

Breve descripción de las figuras

Las realizaciones y experimentos que ilustran los principios de la invención se discutirán ahora con referencia a las figuras adjuntas en donde:

Figuras 1A y Figura 1B. Gráfico que muestra el efecto de los medios acondicionados en la expansión de linfocitos T específicos de EBV a partir de células obtenidas de (1A) Donante 1 y (1B) Donantes 2 y 3. Se añaden porcentajes crecientes de medios acondicionados a los medios de cultivo. Después de una semana de cocultivo con LCL, el número de linfocitos T expandidos se compara con el número original de linfocitos T sembrados.

Figura 2. Gráfico que muestra el efecto de los medios acondicionados sobre la expansión de linfocitos T específicos de EBV a partir de células obtenidas de tres donantes, en un biorreactor Grex-100. Se añaden porcentajes crecientes de medios acondicionados a los medios de cultivo. Después de una semana de cocultivo con LCL, el número de linfocitos T expandidos se compara con el número original de linfocitos T sembrados.

Figura 3. Gráfico que muestra la destrucción específica de células LCL transformadas por EBV por linfocitos T específicos de EBV. Los linfocitos T expandidos mediante cultivo en 0 % y 30 % de medio acondicionado se cultivan conjuntamente con LCL a diferentes proporciones de células efectoras/diana, y la lisis específica de las células LCL se mide después de 4 horas.

Figura 4. Gráfico que muestra el efecto de la presencia de diferentes porcentajes de medios acondicionados en las veces de expansión de CTL específicos de EBV, cultivados en recipientes de cultivo de biorreactor Grex-100.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos los inventores describen la expansión de linfocitos T específicos de EBV incluyendo el cultivo en presencia de medios acondicionados. Los inventores describen experimentos para determinar el porcentaje óptimo de medios acondicionados para incluir en cultivos, y para confirmar la actividad citotóxica de los CTL expandidos.

Ejemplo 1: Porcentaje óptimo de medios acondicionados

Para determinar el porcentaje óptimo de medio acondicionado para la expansión de linfocitos T, en expansiones de linfocitos T realizadas en placas de 24 pocillos, medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, 10 % de FBS, se mezcla L-glutamina 2 mM con 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % y 60 % de medio acondicionado obtenido de un cocultivo de linfocitos T con células LCL.

Después de una semana de cocultivo con células LCL, se cuenta el número de linfocitos T y se compara con el número de células sembradas, para determinar las veces de expansión.

Los resultados de expansión esperados se muestran en la Figura 1A. Los linfocitos T se expanden a un ritmo más rápido mediante los métodos que incluyen el cultivo en presencia de medios acondicionados. Se espera que el porcentaje óptimo de medios acondicionados en una etapa del método de acuerdo con B para la mayor expansión de pliegue sea del 20-30 % de medios acondicionados.

El mismo experimento se realiza en células obtenidas de dos más, donantes diferentes (donantes 2 y 3). Se espera que los resultados sean similares a los del Donante 1, con la máxima expansión de linfocitos T observada en un 20-30 % de medios acondicionados (véase Figura 1B).

Debido a que la expansión a gran escala de los linfocitos T se realizará en biorreactores como por ejemplo, recipientes de cultivo Grex-100, el porcentaje optimizado de medios acondicionados se investiga además en cultivo de biorreactor.

Para fines ilustrativos: Las células se cultivan a una densidad celular de 1×10^6 células/ml en 200 ml de medio, de los cuales porcentajes variables son medios acondicionados:

| Medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM | Medios acondicionados | % de medios acondicionados |
|--|-----------------------|----------------------------|
| 160 ml | 40 ml | 20 % |
| 140 ml | 60 ml | 30 % |
| 120 ml | 80 ml | 40 % |
| 100 ml | 100 ml | 50 % |
| 80 ml | 120 ml | 60 % |

5 Los resultados esperados para la expansión de linfocitos T se muestran en la Figura 2. Se espera que el porcentaje óptimo de medios acondicionados sea del 20-30 %, coherente a través de diferentes donantes.

10 Ejemplo 2: Generación de LCL transformadas por EBV y expansión de CTL específicos de EBV

La sangre periférica (40-60 ml) obtenida de pacientes con NPC positivo para EBV se usa para generar líneas de linfocitos B linfoblastoides transformados con EBV y linfocitos T específicos de EBV.

15 Generación de LCL transformados por EBV

En resumen, para la generación LCL, 15×10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se incuban con sobrenadante concentrado de cultivos B95-8, en presencia de $1 \mu\text{g/ml}$ de ciclosporina A (Sandoz, Viena, Austria) para establecer una LCL.

20 Las LCL se irradian a 60 Gy antes de usarse para estimuciones (el día de la estimulación).

Expansión de linfocitos T específicos de EBV

25 Se compara la expansión de linfocitos T específicos de EBV por dos métodos diferentes.

En ambos métodos, una primera estimulación se realiza de la siguiente manera:

- 60×10^6 PBMC se resuspenden en medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM, y se realiza un recuento de células viables.
- Las PBMC se siembran a 2×10^6 células/pocillo en pocillos de una placa de 24 pocillos.
- Las PBMC se estimulan con LCL autólogas tratadas con aciclovir, irradiadas en una proporción de respondedor a estimulador de 40:1.
- Las células se cultivan durante 9-12 días a 37°C en una atmósfera de un 5 % de CO_2 .

35 En ambos métodos, luego se realiza una segunda estimulación, de la siguiente manera:

- Las células se recogen al final de la primera estimulación, se realiza un recuento de células viables y las células se resuspenden a 1×10^6 células/ml en medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM.
- Se añade 1 ml de células en pocillos de placas de 24 pocillos, o la suspensión celular se añade a biorreactores a una concentración de 15×10^6 células/Grex10, en medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM, y las células se reestiman con LCL irradiadas autólogas en una proporción de respondedor a estimulador de 4:1.
- Las células se cultivan durante 3-4 días, y luego las células se resuspenden en medios de cultivo celular frescos que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM. IL-2 humana recombinante (rhIL-2, Proleuquina; Chiron Emeryville, CA) se añade al cultivo celular a una concentración final de 40-100 IU/ml.

50 Estimulaciones posteriores

Después de la segunda estimulación, se recolectan células, se realiza un recuento de células viables. Los medios de cultivo (es decir, los medios acondicionados) se retienen para su uso en el método B a continuación. Las células se resuspenden a 1×10^6 células/ml (en placa de 24 pocillos) o $0,5 \times 10^6$ células/ml (en Grex10) en medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM y se

reestiman con LCL irradiadas autólogas en una proporción de respondedor a estimulador de 4:1.

Una vez que se consiguen 200×10^6 células, las células se estimulan de acuerdo con el método A o el método B:

| Etapa A del Método | Etapa B del Método |
|--|---|
| <p>100 x 10⁶ células se resuspenden en 200 ml de medio de cultivo celular que comprende 45 % de RPMI 1640, 45 % de medio de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM, se transfieren a GRex 100, y las células se reestiman con LCL autólogas irradiadas en una proporción de respondedor a estimulador de 4:1, con rhIL-2 añadido a una concentración final de 40-100 IU/ml.</p> <p>Las células se cultivan durante 3-4 días a 37 °C en una atmósfera de un 5 % de CO₂.</p> | <p>100 x 10⁶ células se resuspenden en:</p> <p>(1) 180 ml de medio de cultivo celular que comprende 45 % de RPMI 1640, 45 % de medio de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM, y;</p> <p>(2) 20 ml de medio acondicionado obtenido del cultivo al final de la segunda estimulación (es decir, 10 % de medios acondicionados), se transfieren a GRex 100, y las células se reestiman con LCL autólogas irradiadas en una proporción de respondedor a estimulador de 4:1, con rhIL-2 añadido a una concentración final de 40-100 IU/ml.</p> <p>Las células se cultivan durante 3-4 días a 37 °C en una atmósfera de un 5 % de CO₂.</p> |

5 Al final de una estimulación de acuerdo con la etapa del método A o la etapa del método B, las células se recogen y se reestiman de acuerdo con el mismo método, etapa A o B.

10 Para re-simulaciones de acuerdo con la etapa B del método, los medios acondicionados usados son de la estimulación precedente de acuerdo con B.

Ejemplo 3: Ensayo de eficacia

15 La actividad citotóxica de los CTL expandidos por métodos que incluyen cultivo en presencia de medios acondicionados se compara con la actividad citotóxica de los CTL expandidos sin cultivo en presencia de medios acondicionados.

20 Los linfocitos T expandidos de 0 % y 30 % de medio acondicionado se añaden a las células LCL a diferentes relaciones de células efectoras/diana (relación E/T), y después de 4 horas, se mide la lisis específica de las células LCL. Se espera que haya muy poca o ninguna diferencia entre la lisis específica para las células expandidas mediante cultivo en 0 % y 30 % de medios acondicionados (Figura 3).

25 Se espera que los CTL expandidos a una velocidad mayor retengan la capacidad de matar específicamente células LCL transformadas con EBV.

Ejemplo 4: Optimización del crecimiento de linfocitos T específicos del virus de Epstein-Barr (EB-VST) usando medio acondicionado

30 El siguiente ejemplo describe una investigación del porcentaje óptimo de medios acondicionados que se incluirán en las reestimulaciones para una expansión máxima de CTL.

Semana 1:

- Las muestras de línea celular linfoblastoidea (LCL) se descongelaron y cultivaron durante 1 semana
- Requiere un mínimo de 10×10^6 LCL para iniciar el experimento

Semana 2:

- Se descongelaron células EB-VST03 congeladas de diferentes pacientes, se resuspendieron en medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM, y se realizó un recuento de células viables
 - Las células EB-VST03 se obtuvieron mediante cultivo de PMBC de acuerdo con el Ejemplo 2, en donde las PMBC se sometieron a una primera y segunda estimulación, y luego a una tercera estimulación de acuerdo con la Etapa A del Método (es decir, en ausencia de medios acondicionados), después de lo cual las células puntuales fueron cosechadas y congeladas
- Se sembraron células EB-VST03 a 1×10^6 células/pocillo de una placa de 24 pocillos
- Se añadieron suspensiones celulares a biorreactores (15×10^6 células/G-Rex 10) en medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM, y se reestimularon

con LCL autólogas irradiadas en una relación Respondedor:Estimulador de 4:1.

- Las células se cultivaron durante 3-4 días y luego se resuspendieron en medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM.
- Luego se añadió IL-2 al cultivo celular a una concentración final de 40-100 UI/ml.

5

Semana 3 en adelante:

• Las células se cosecharon, se agruparon, se contaron y se estimularon como se ha descrito en la semana 2 anterior hasta que hubo 120×10^6 células.

- 10
- 100×10^6 células se sembraron luego en matraces G-Rex 100 en medios de cultivo celular que comprendían 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM, y diferentes porcentajes de medios acondicionados (obtenidos del cultivo al final del cultivo de estimulación anterior), de la siguiente manera:

| Medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM | Medios acondicionados | % de medios acondicionados |
|---|------------------------------|-----------------------------------|
| 200 ml | 0 ml | 0 % |
| 170 ml | 30 ml | 15 % |
| 140 ml | 60 ml | 30 % |
| 110 ml | 90 ml | 45 % |

- 15
- Las células se cultivaron durante 3-4 días a 37 °C en una atmósfera de un 5 % de CO₂.
 - Luego se añadió IL-2 al cultivo celular a una concentración final de 40-100 UI/ml.
 - Después de una semana, las células se cosecharon y se realizó un recuento de células viables.

Se observó que todas las viabilidades eran superiores al 70 %. Los resultados se muestran en la Figura 4.

20

Se encontró que el cultivo en medios de cultivo celular que comprende 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM y hasta 15 % de medios acondicionados dieron el mayor rendimiento de EB-VST, que fue -20 % mayor que la tasa de EB-VST en comparación con el uso del 100 % de los medios de cultivo celular que comprenden 45 % de RPMI 1640, 45 % de medios de Click, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM.

25

Las veces de expansión de EB-VST disminuyeron cuando se usaron porcentajes más altos (es decir, 30 %, 45 %) de los medios acondicionados.

- 30
- Las veces de expansión observadas para la Muestra 3-EB-VST no fueron tan pronunciada como las observadas para la Muestra 1 y la Muestra 2. Esto podría deberse a que la muestra 3 EBV-VST se sometió a un ciclo adicional de estimulación, con el resultado de que el crecimiento celular estaba sobrecargado.

35

Se concluye que una combinación de 15 % de medios acondicionados con 85 % de medios de cultivo frescos (medio de Click completo) produjo el mayor rendimiento de EB-VST, es decir, una mayor tasa de expansión de EB-VST en comparación con el uso de medios de cultivo 100 % frescos.

Aunque el efecto del medio acondicionado sobre el crecimiento de EB-VST varía entre los diferentes individuos, se observó que en cada caso, el uso de 15 % de medio acondicionado daba la mejor tasa de expansión.

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus o acelerar la tasa de expansión de una población de linfocitos T específica de virus, que comprende estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación que comprende linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus.
2. Un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica para un virus, que comprende:
- (i) estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus; y
 - (ii) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el método comprende:
- (i) estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus;
 - (ii) recoger las células obtenidas en la etapa (i), y;
 - (iii) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el método comprende:
- (i) estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que presentan un péptido del virus;
 - (ii) recoger las células obtenidas en la etapa (i);
 - (iii) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus;
 - (iv) recoger las células obtenidas en la etapa (iii); y
 - (v) reestimar los linfocitos T mediante cultivo en presencia de APC que presentan un péptido del virus, en donde del 10 % al 25 % de los medios en que se cultivan las células son medios acondicionados obtenidos de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los medios acondicionados se obtienen del cultivo de estimulación de la etapa (iii).
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los medios acondicionados se obtienen de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC que presentan un péptido del virus después de un periodo de cultivo de 1 a 8 días.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los medios acondicionados se obtienen a partir de un cultivo de estimulación de linfocitos T y APC en una relación respondedor:estimulador de 1:1 a 10:1.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las APC que presentan un péptido del virus son células de la línea celular linfoblastoidea (LCL) transformada por EBV.
9. Un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica del virus de Epstein-Barr (EBV) o acelerar la tasa de expansión de una población de linfocitos T específica de virus, que comprende estimular los linfocitos T mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días, en medios que comprenden:
- (a) medios de cultivo celular que comprenden el 40-50 % de medio RPMI-1640, el 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM,
 - (b) del 10 % a 25 % de medios acondicionados obtenidos por un método que comprende: estimular linfocitos T mediante cultivo en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 en medios de cultivo celular que comprenden el 40-50 % de medio RPMI-1640, el 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, y añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 IU/ml, durante un periodo de 1 a 8 días, y
 - (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 IU/ml.
10. Un método para generar o expandir una población de linfocitos T específica del virus de Epstein-Barr (EBV), que comprende:

- (i) estimular los linfocitos T mediante cultivo de PBMC en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 10:1 a 80:1 en medios de cultivo celular que comprenden el 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM durante un periodo de 7 a 14 días;
- 5 (ii) recoger las células obtenidas en la etapa (i);
- (iii) reestimular los linfocitos T mediante el cultivo de células recogidas en la etapa (ii) en presencia de LCL transformadas con EBV a una relación de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 en medios de cultivo celular que comprenden el 40-50 % de medio RPMI-1640, el 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, y añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 IU/ml, durante un periodo de 1 a 8 días;
- 10 (iv) recoger las células obtenidas en la etapa (iii), y;
- (v) reestimular los linfocitos T mediante cultivo de células recogidas en la etapa (iv) en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días en medio que comprende: (a) medios de cultivo celular que comprenden el 40-50 % de medio RPMI-1640, el 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, (b) del 10 % al 25 % de medios acondicionados obtenidos en el punto final de la etapa (iii), y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 (por ejemplo, 40-100) UI/ml.
- 15
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el método además comprende:
- 20 (vi) recoger las células obtenidas en la etapa (v), y;
- (vii) reestimular los linfocitos T mediante el cultivo de células recogidas en la etapa (vi) en presencia de LCL transformadas con EBV en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días en un medio que comprende: (a) medios de cultivo celular que comprenden el 40-50 % de medio RPMI-1640, 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, (b) al menos un 10 % de medio acondicionado obtenido en el punto final de la etapa (v), y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 (por ejemplo, 40-100) UI/ml.
- 25
12. El método de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde el método comprende etapas adicionales de recolección de células y reestimulación de los linfocitos T mediante el cultivo de las células recolectadas en presencia de LCL transformadas con EBV (por ejemplo, LCL irradiadas, transformadas con EBV) en una proporción de respondedor a estimulador de 2:1 a 7:1 durante un periodo de 1 a 8 días en medios que comprenden: (a) medios de cultivo celular que comprenden el 40-50 % de medio RPMI-1640, el 40-50 % de medio de Click, FBS al 5-20 % y L-glutamina 1-5 mM, (b) del 10 % al 25 % de medio acondicionado obtenido en el punto final de la etapa de estimulación precedente, y (c) añadir IL-2 a una concentración final de 10-200 UI/ml.
- 30
- 35
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el método además comprende:
- 40 mezclar la población generada o expandida de linfocitos T con un vehículo, un adyuvante, un excipiente o un diluyente farmacéuticamente aceptables.

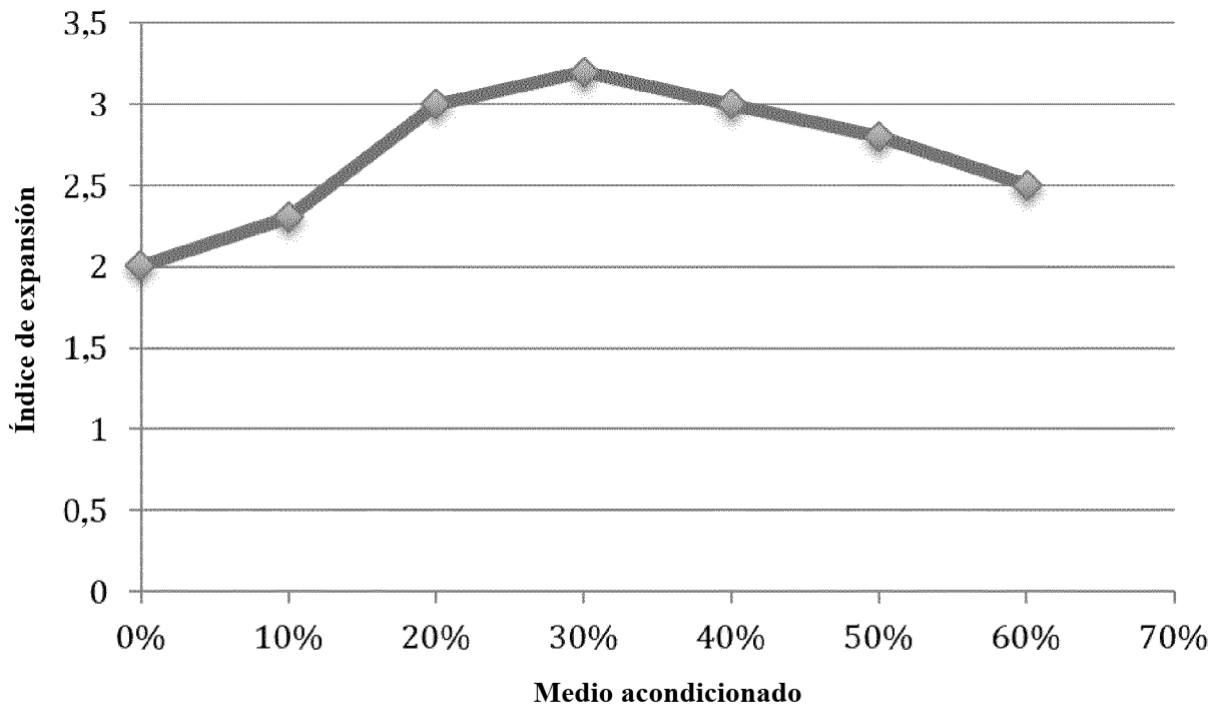


Figura 1A

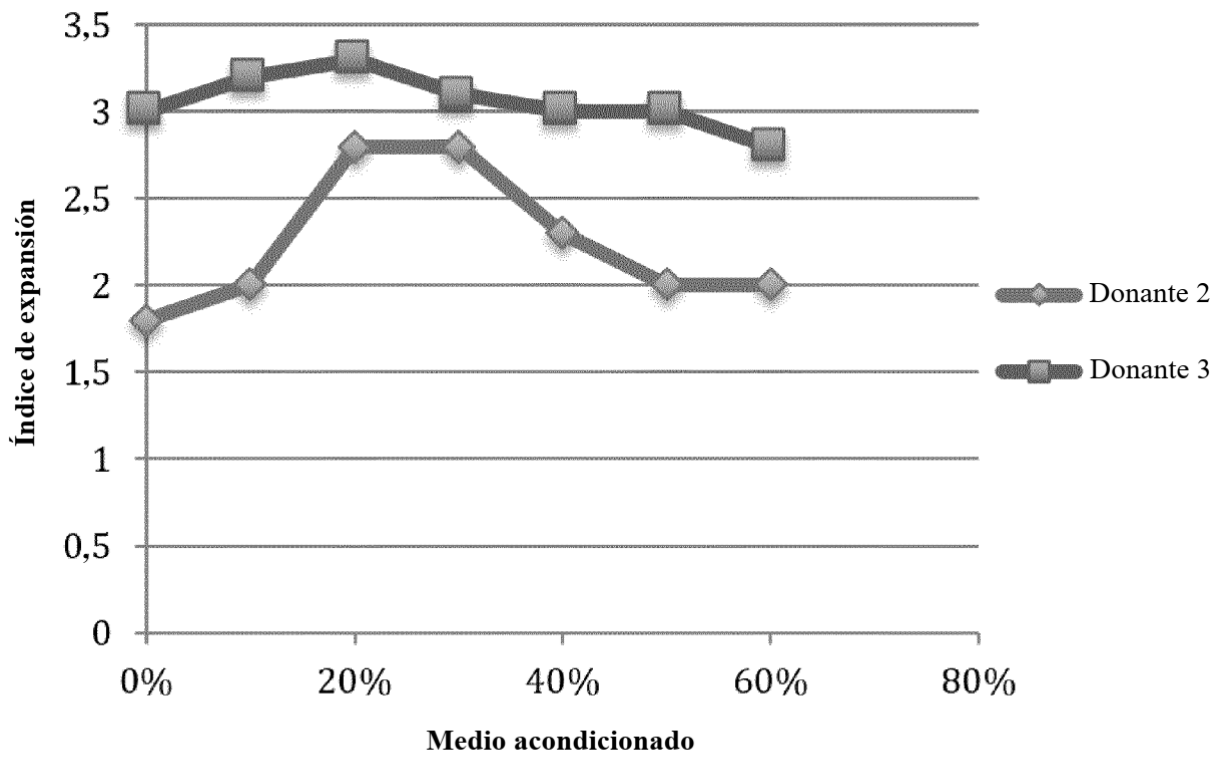


Figura 1B

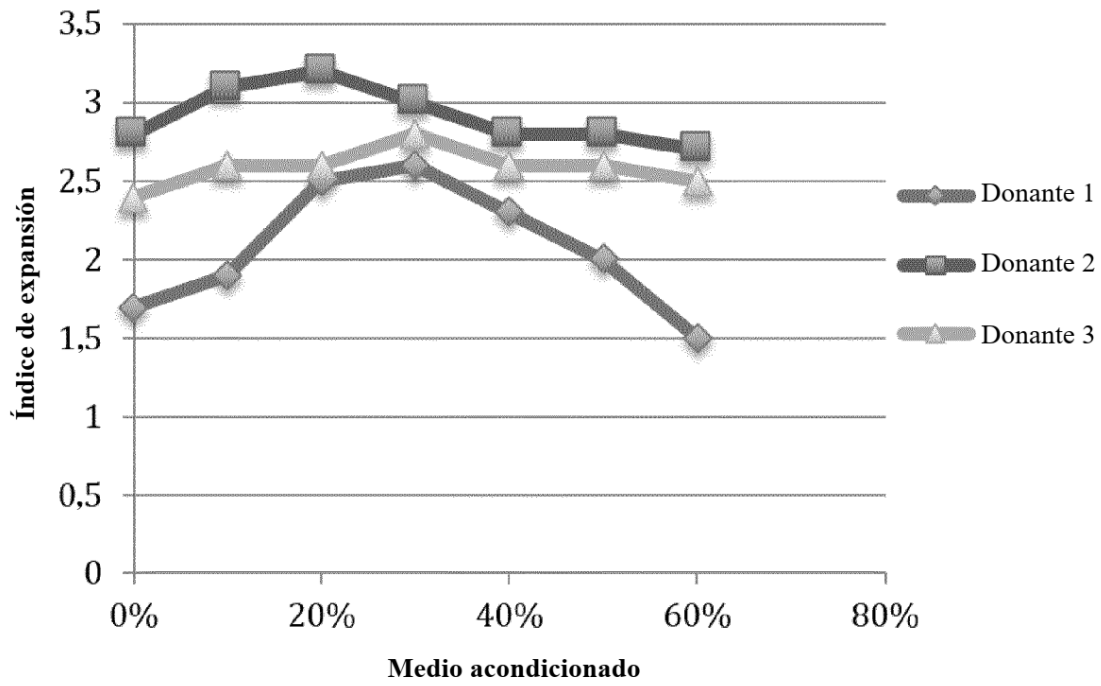


Figura 2

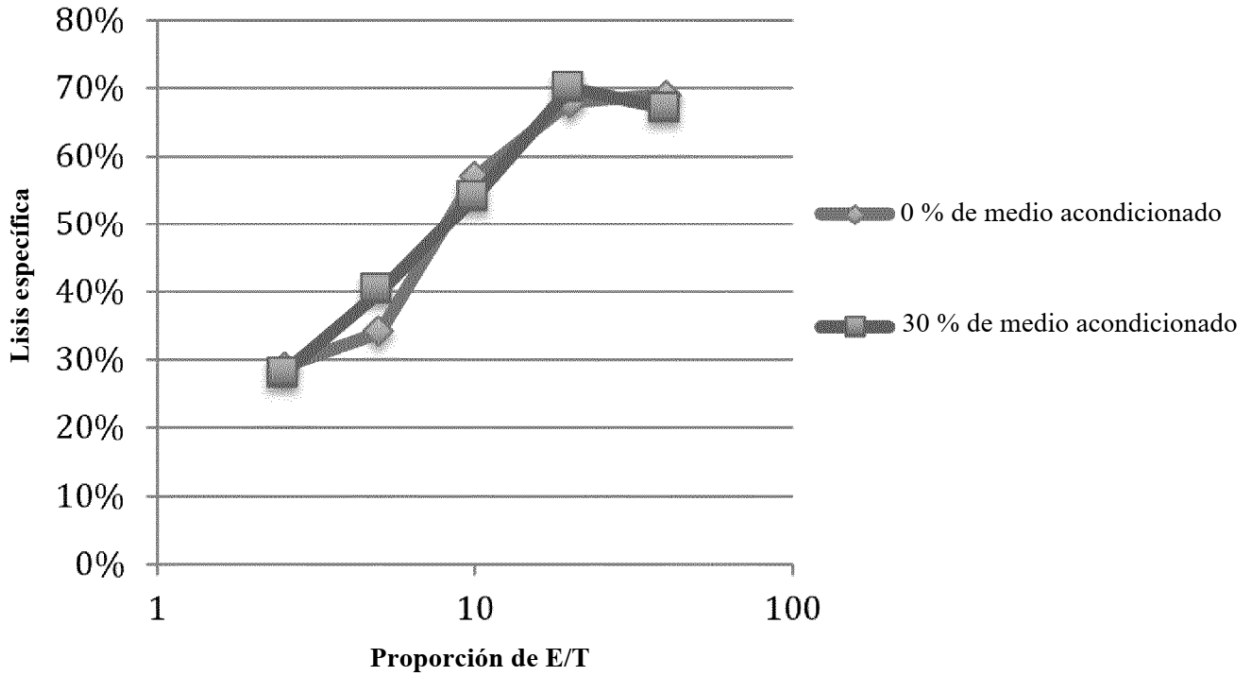


Figura 3

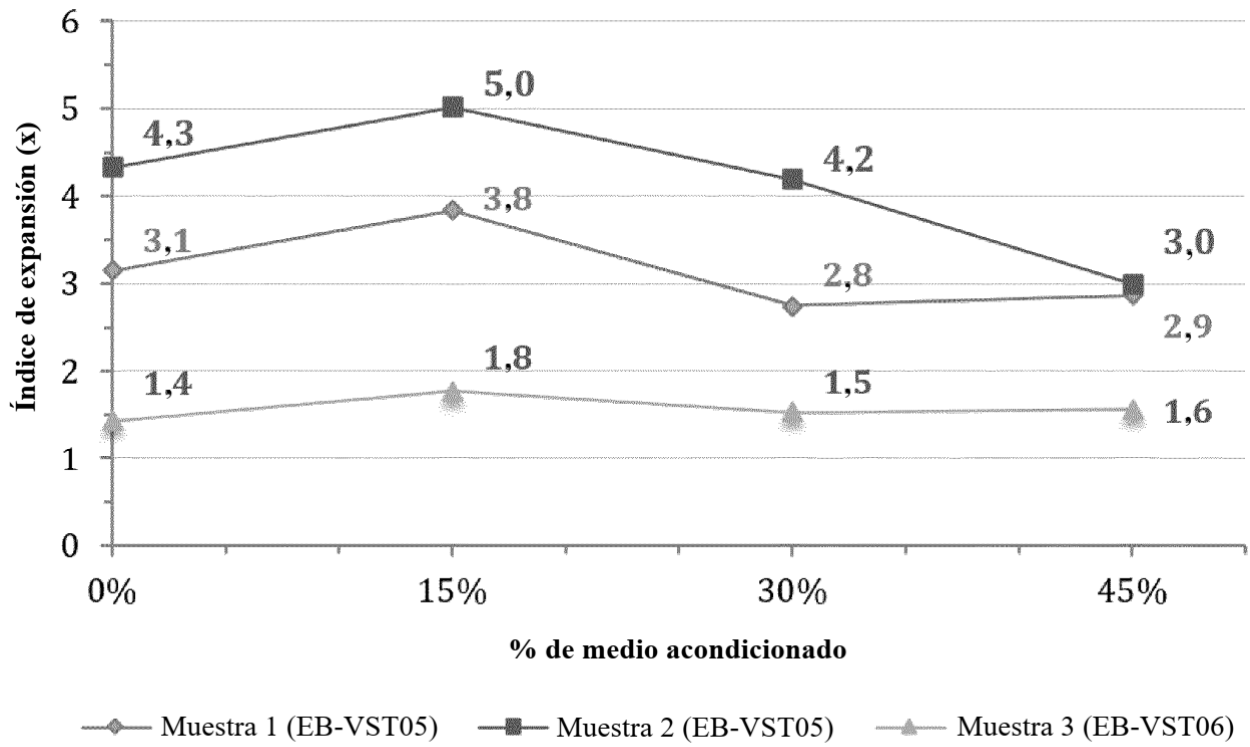


Figura 4