

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 914**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2015 PCT/CA2015/050846**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2016 WO16033690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2015 E 15838102 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3189132**

54 Título: **Complejos de anticuerpo solubles para la activación y expansión de linfocitos T o células NK**

30 Prioridad:

**04.09.2014 US 201462045591 P**

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

**02.03.2021**

73 Titular/es:

**STEMCELL TECHNOLOGIES INC. (100.0%)  
570 West Seventh Avenue Suite 400  
Vancouver, British Columbia V5Z 1B3, CA**

72 Inventor/es:

**KOKAJI, ANDY, ISAMU**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 808 914 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

Complejos de anticuerpo solubles para la activación y expansión de linfocitos T o células NK

5 **Campo**

Esta divulgación se refiere a métodos y composiciones de complejos de anticuerpo monoespecíficos solubles para la activación y expansión de linfocitos T o células NK humanas.

10 **Antecedentes**

La tolerancia del hospedador y la inmunidad adaptable son componentes complejos y críticos de la salud humana. Los linfocitos T están comprendidos de diversos subconjuntos incluyendo los linfocitos T reguladores, los cuales juegan un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia del hospedador; subconjuntos efectorales tales como las células auxiliares T CD4+ y los linfocitos T citotóxicos CD8+ que llevan a cabo respuestas inmunitarias de acuerdo con los estímulos ambientales.

Los métodos para el crecimiento y la propagación de los linfocitos T *in vitro* se han basado en un número de diferentes estrategias. En algunas circunstancias, los linfocitos T se activan y expanden mediante el uso de células accesorias y factores de crecimiento exógenos, tales como células presentadoras de antígeno y IL-2. Esto requiere la presencia y reposición de células accesorias y factores de crecimiento durante el transcurso de la activación y/o expansión de los linfocitos T.

Como alternativa, los reactivos usados para la activación y expansión de los linfocitos T consisten en una combinación de inmovilización directa o indirecta de anticuerpos anti-CD3, sobre una superficie de fase sólida tal como una placa o una perla magnética. Además de la señal de activación de los linfocitos T primaria proporcionada por los anticuerpos anti-CD3 inmovilizados, se requiere una señal de coestimulación secundaria proporcionada por anticuerpos anti-CD28. También se pueden añadir factores de crecimiento exógenos o citoquinas tales como IL-2 para aumentar la proliferación de los linfocitos T.

Los anticuerpos contra CD3 son un componente crítico en muchos protocolos de estimulación de linfocitos T policlonales. Primero Dixon et al. demostraron, que el anti-CD3 inmovilizado podría mediar la activación y expansión de los linfocitos T humanos en ausencia del reconocimiento de antígeno cognado por el receptor de linfocito T. El anti-CD3 inicia la cascada de señalización de la activación y proliferación entrecruzando los componentes del complejo receptor de linfocito T en la superficie de los linfocitos T; por eso su requerimiento de inmovilización. Posteriormente Baroja et al. demostraron, que se requería una segunda señal de un estímulo anti-CD28 o bien inmovilizado o soluble para la activación completa de linfocito T en combinación con anti-CD3 inmovilizado. Las señales coestimuladoras adicionales proporcionadas a través de ligandos de adhesión tales como CD2, LFA-1 y otros miembros de la familia de TNF tales como CD137 (4-1BB) pueden proporcionar señales proliferativas o de supervivencia adicionales a los linfocitos T (Smith-Garvin et. al.).

Los productos comerciales para la activación de linfocito T que usan placas de cultivo de tejido recubiertas con anticuerpos anti-CD3 inmovilizados están disponibles de Corning (placas de activación de linfocitos T BioCoat™, N.º de Cat 354725) y los investigadores los preparan mucho usando métodos convencionales conocidos por los expertos con la técnica. Los anticuerpos anti-CD28 solubles se pueden añadir de manera exógena para proporcionar la señal coestimuladora necesaria para iniciar la activación y proliferación de los linfocitos T (Kruisbeek et. al.).

La patente de los Estados Unidos 6.352.694, describe un método para la activación y expansión de los linfocitos T usando anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados sobre una partícula magnética de 4,5 µm de diámetro.

La patente de los Estados Unidos 8.012.750B2 describe un dispositivo biodegradable para activar los linfocitos T. De manera similar a la divulgación anterior, el método usa una microesfera biodegradable indirectamente recubierta con anticuerpos capaces de unirse a y activar los linfocitos T.

La solicitud de patente de los Estados Unidos 14/035.089 describe el uso de una nanomatriz flexible con anti-CD3 y/o anti-CD28 inmovilizados para proporcionar una señal de activación para los linfocitos T. Esto desvela una matriz de dextrano entre 1-500 nm de tamaño que funciona como un armazón flexible que puede moldearse sobre la superficie de un linfocito T que tiene anticuerpos de activación de linfocitos T inmovilizados.

A diferencia de los anticuerpos inmovilizados, los complejos de anticuerpo solubles pueden proporcionar una señal de activación más suave a los linfocitos T. La solicitud de los Estados Unidos N.º US 2007/0036783 describe el uso de complejos de anticuerpo tetramérico (TAC) biespecíficos solubles compuestos de un anticuerpo anti-CD3 en complejo con un segundo anticuerpo contra CD28 que pueden iniciar la activación y expansión de los linfocitos T. Reivindican que esta estrategia proporciona un estímulo más suave dando como resultado muerte celular inducida por menor activación en comparación con los métodos de anticuerpo inmovilizado. Los inventores de esta solicitud no demostraron completamente que los complejos de anticuerpo tetramérico eran en realidad solubles y no se adsorbían

sobre el plástico de cultivo durante el transcurso de la estimulación. Además, los inventores específicamente indican que el uso de complejos de anticuerpo tetramérico biespecíficos están implicados en la activación y expansión de los linfocitos T estimulados.

5 Wacholtz et al. (*J. Immunol.* 142(12), 4201--4212, 1989) examinan la estimulación de clones de linfocito T acoplado CD3, CD4/CD8 y moléculas MHC-I, solas o en combinación.

Geppert et al. (*J. Immunol.* 140(7), 2155-2164, 1988) describen la activación de linfocitos T4 humanos entrecruzando moléculas MHC-I.

10 Lansdorp et al. (*Eur. J. Immunol.* 16(6), 679--683, 1986) describen complejos de anticuerpo tetramérico (TAC) biespecíficos preparados a partir de mezclas de anticuerpos monoclonales. Véase también el documento US 4.868.109 A.

15 El documento US 7.135.340 B2 describe el uso de complejos de anticuerpo tetramérico para bloquear el marcaje no específico de antígenos en los ensayos inmunológicos.

### Sumario

20 El presente inventor ha desarrollado un método para el uso de complejos de anticuerpo tetramérico monoespecíficos solubles para la activación y expansión de linfocitos T humanos primarios o células NK *in vitro*. En particular, el inventor ha determinado que usar complejos de anticuerpo tetramérico monoespecíficos solubles da como resultado una mayor activación de los linfocitos T en comparación con el uso de complejos de anticuerpo tetramérico biespecíficos. El inventor también ha determinado que usar complejos de anticuerpo tetramérico monoespecíficos solubles da como resultado una mejora en la activación de las células NK en comparación con células NK cultivadas en ausencia de complejos de anticuerpo tetramérico monoespecíficos solubles.

25 Los TAC monoespecíficos solubles tienen ventaja sobre los métodos de anticuerpo inmovilizado puesto que las grandes partículas magnéticas no necesitan de ser retiradas tras la expansión y las células se pueden lavar para retirar cualquier complejo TAC soluble no unido; tampoco es un requerimiento para las placas o matrices recubiertas con anticuerpo especializadas.

30 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método de activación de los linfocitos T o las células NK que comprende cultivar una muestra que contiene linfocitos T o células NK con una composición que comprende al menos un complejo monoespecífico soluble, en la que cada complejo monoespecífico soluble comprende dos proteínas de unión que se ligan y se unen al mismo antígeno sobre los linfocitos T o las células NK, y en la que el antígeno sobre los linfocitos T o las células NK es cualquier antígeno que activa dichos linfocitos T o células NK.

35 En una realización, la composición comprende al menos dos complejos de anticuerpo monoespecíficos diferentes, en la que un complejo de anticuerpo monoespecífico se une a un primer antígeno sobre los linfocitos T o las células NK que activa dichos linfocitos T o células NK y el otro complejo de anticuerpo monoespecífico se une a un segundo antígeno sobre los linfocitos T o las células NK que activa dichos linfocitos T o células NK. Opcionalmente, la composición comprende al menos tres complejos de anticuerpo monoespecíficos diferentes, en la que el primer complejo de anticuerpo monoespecífico se une a un primer antígeno que activa dichos linfocitos T o células NK, el segundo complejo de anticuerpo monoespecífico se une a un segundo antígeno que activa dichos linfocitos T o células NK y el tercer complejo de anticuerpo monoespecífico se une a un tercer antígeno sobre los linfocitos T o las células NK que activa dichos linfocitos T o células NK.

40 En una realización, las proteínas de unión descritas en el presente documento que se unen a antígenos sobre los linfocitos T o las células NK son anticuerpos o fragmentos de los mismos. En una realización, los complejos monoespecíficos solubles son complejos de anticuerpo tetramérico (TAC). En una realización, los TAC están compuestos de dos anticuerpos de una especie unidos por dos moléculas de anticuerpo de una segunda especie que se unen a la parte Fc de los anticuerpos de la primera especie animal.

45 En una realización, los métodos descritos en el presente documento son para activar los linfocitos T. En una realización, el método comprende cultivar una muestra que contiene linfocitos T con una composición que comprende un complejo de anticuerpo monoespecífico que se une a un primer antígeno sobre los linfocitos T y otro complejo de anticuerpo monoespecífico que se une a un segundo antígeno sobre los linfocitos T. En una realización, el primer antígeno se selecciona de CD3, CD28, CD2, CD7, CD11a, CD26, CD27, CD30L, CD40L, OX-40, ICOS, GITR, CD137, y HLA-DR y el segundo antígeno es un antígeno diferente seleccionado de CD3, CD28, CD2, CD7, CD11a, CD26, CD27, CD30L, CD40L, OX-40, ICOS, GITR, CD137, y HLA-DR. En una realización, el primer antígeno es CD3. En una realización, el segundo antígeno es CD28. En una realización, el tercer antígeno es CD2.

50 En una realización, la activación de los linfocitos T es proliferación de linfocito T aumentada, producción de citoquina aumentada y/o expresión de linfocito T aumentada.

En una realización, la presente divulgación describe el uso de complejos de anticuerpo tetramérico mono-específicos solubles que se dirigen a CD3, CD28 y CD2 humanas para inducir activación policlonal y expansión *in vitro* óptima de linfocitos T humanos. En dicha realización, la composición comprende tres complejos mono-específicos solubles diferentes que se dirigen a CD3, CD28 y CD2.

5 En otra realización, los métodos descritos en el presente documento son para activar las células NK. En una realización, el método comprende cultivar una muestra que contiene células NK con una composición que comprende un complejo de anticuerpo mono-específico que se une a un primer antígeno sobre las células NK y otro complejo de anticuerpo mono-específico que se une a un segundo antígeno sobre las células NK. En una realización, el primer antígeno se selecciona de CD335, CD2, NKG2D, NKp44, NKp30, CD16, LFA-1 y CD27 y el segundo antígeno es un antígeno diferente seleccionado de CD335, CD2, NKG2D, NKp44, NKp30, CD16, LFA-1 y CD27. En una realización, el primer antígeno es CD335. En una realización, el segundo antígeno es CD2.

15 En una realización, la activación de las células NK es proliferación de célula NK aumentada, producción de citoquina aumentada y/o expresión de célula NK aumentada.

En una realización, la presente divulgación describe el uso de complejos de anticuerpo tetramérico mono-específicos solubles que se dirigen a CD335 y CD2 humanas para inducir activación y expansión *in vitro* de células NK humanas. En dicha realización, la composición comprende dos complejos mono-específicos solubles diferentes que se dirigen a CD335 y CD2.

Otras características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos aunque indican realizaciones preferidas de la divulgación se dan únicamente a modo de ejemplo.

## 25 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de la proliferación de linfocitos T humanos evaluada por dilución de colorante CFSE usando una mezcla de TAC mono-específico específico para CD3 o CD28, o usando una mezcla de TAC biespecífico contra CD3 y CD28 tras 7 días en cultivo.

La Figura 2 muestra los resultados de la activación y proliferación de linfocitos T usando composiciones de TAC mono-específico soluble y perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® usando placas de cultivo de tejido sin tratar o bloqueadas.

La Figura 3 muestra los resultados de un ensayo de producción de citoquina intracelular a corto plazo tras la estimulación con composiciones de TAC mono-específico soluble o perlas CD3/CD28 activadoras de T humanos Dynabead®.

La Figura 4 muestra imágenes representativas de linfocitos T expandidos usando TAC para CD3, CD28 y CD2 mono-específico soluble o perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® durante el transcurso de 21 días.

La Figura 5 muestra los resultados de una expansión de linfocito T de 21 días usando o bien TAC para CD3, CD28 y CD2 mono-específico soluble o perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead®.

La Figura 6A muestra la pureza de células NK mantenidas en medio ImmunoCult-XF complementado con IL-2 sin estimulación o estimuladas con TAC para CD335/CD2 mono-específicos. La Figura 6B muestra el cambio en el número total de células mantenidas sin estimulación o estimuladas con TAC para CD335/CD2 mono-específicos. Se observó un incremento en la activación de las células NK tras la estimulación con cóctel de TAC para NKp46 (CD335) y CD2 en presencia de 500 UI/ml de IL-2 en comparación con el cultivo de células NK solas en presencia de 500 UI/ml de IL-2.

## 55 Descripción detallada

La presente divulgación proporciona un método de activación y expansión de linfocitos T humanos o células asesinas naturales (NK) *in vitro* usando un complejo mono-específico tal como un complejo de anticuerpo tetramérico.

60 Por consiguiente, en una realización, la presente divulgación proporciona un método de activación de linfocitos T que comprende cultivar una muestra que contiene linfocitos T con una composición que comprende al menos un complejo mono-específico soluble, en la que cada complejo mono-específico soluble comprende dos proteínas de unión que se ligan y se unen al mismo antígeno sobre los linfocitos T, y en la que el antígeno sobre los linfocitos T o las células NK es cualquier antígeno que activa dichos linfocitos T o células NK. En una realización, la presente divulgación también proporciona un método de activación de células NK que comprende una muestra que contiene células NK con una composición que comprende al menos un complejo mono-específico soluble, en la que cada complejo mono-específico soluble comprende dos proteínas de unión que se ligan y se unen al mismo antígeno sobre las células NK que activa

dichos linfocitos T o células NK. En una realización, las células NK se cultivan en presencia de IL-2 y/o una u otras más citoquinas tales como IL-7 o IL-15. En una realización, los linfocitos T o las células NK son células humanas.

5 El término "complejo mono-específico soluble" como se usa en el presente documento significa un complejo que comprende dos proteínas de unión que se ligan, directa o indirectamente, unas a otras y se unen al mismo antígeno. Las dos proteínas de unión son solubles y no están inmovilizadas sobre una superficie, partícula o perla. En una realización, las proteínas de unión se unen al mismo antígeno sobre los linfocitos T. En otra realización, las proteínas de unión se unen al mismo antígeno sobre las células NK.

10 En una realización, las dos proteínas de unión son la misma proteína de unión y se unen al mismo epítipo sobre el antígeno.

15 El término "complejo biespecífico" como se usa en el presente documento significa un complejo que comprende dos proteínas de unión diferentes que se ligan, directa o indirectamente, una a otra en el que cada proteína de unión se une a un antígeno diferente sobre los linfocitos T o las células NK.

El término "activar los linfocitos T" incluye, sin limitación, inducir la proliferación de los linfocitos T, inducir la producción de citoquina de los linfocitos T e inducir la expansión de los linfocitos T.

20 En "antígeno sobre los linfocitos T" puede ser cualquier antígeno que activa los linfocitos T incluyendo, sin limitación, CD3, CD28, CD2, CD7, CD11a, CD26, CD27, CD30L, CD40L, OX-40, ICOS, GITR, CD137, y HLA-DR.

El término "activar las células NK" incluye, sin limitación, inducir la proliferación de las células NK, inducir la producción de citoquina de las células NK e inducir la expansión de las células NK.

25 El "antígeno sobre las células NK" puede ser cualquier antígeno que activa las células NK incluyendo, sin limitación, CD335, CD2, NKG2D, NKp44, NKp30, CD16, LFA-1 y CD27.

30 En una realización específica, las proteínas de unión son anticuerpos o fragmentos de los mismos. Los fragmentos de anticuerpo que se pueden usar incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv y dsFv de fuentes recombinantes y/o producidos en animales transgénicos. El anticuerpo o fragmento puede ser de cualquier especie incluyendo ratones, ratas, conejos, hámsteres y seres humanos. Los derivados de anticuerpo quimérico, es decir, las moléculas de anticuerpo que combinan una región variable de animal no humano y una región constante humana también se contemplan dentro del alcance de la invención. Las moléculas de anticuerpo quimérico pueden incluir, por ejemplo, anticuerpos humanizados que comprenden el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de un ratón, rata o de otra especie, con regiones constantes humanas. Se pueden usar métodos convencionales para producir anticuerpos quiméricos. (Véase, por ejemplo, Morrison et al.; Takeda et al., Cabilly et al., Patente de los Estados Unidos N.º 4.816.567; Boss et al., Patente de los Estados Unidos N.º 4.816.397; Tanaguchi et al., Publicación de patente europea EP171496; Publicación de patente europea 0173494, Patente del Reino Unido GB 2177096B). La preparación de los anticuerpos humanizados se describe en el documento EP-B 10 239400. Los anticuerpos humanizados también se pueden producir comercialmente (Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña.). Se espera que los anticuerpos quiméricos sean menos inmunogénicos en un sujeto humano que el correspondiente anticuerpo no quimérico. Los anticuerpos humanizados además se pueden estabilizar, por ejemplo, como se describe en el documento WO 00/61635.

45 Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a antígenos de linfocito T o antígenos de célula NK están comercialmente disponibles o pueden ser preparados por un experto en la técnica.

50 En una realización, los dos anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen al mismo antígeno están ligados directamente. La unión directa de los anticuerpos se puede preparar mediante acoplamiento químico de un anticuerpo al otro, por ejemplo, usando N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP).

55 En otra realización, los dos anticuerpos están indirectamente ligados en el complejo mono-específico soluble. Por "indirectamente ligados" se quiere decir que los dos anticuerpos no están ligados directamente de manera covalente uno a otro pero están unidos a través de un resto de unión tal como un complejo inmunológico. En una realización preferida, los dos anticuerpos están ligados indirectamente preparando un complejo de anticuerpo tetramérico. Un complejo de anticuerpo tetramérico se puede preparar mezclando anticuerpos monoclonales que se unen al mismo antígeno y son de la misma especie animal con aproximadamente una cantidad equimolar de anticuerpos monoclonales de una segunda especie animal que se dirigen contra los fragmentos Fc de los anticuerpos de la primera especie animal. El primer y segundo anticuerpo también se puede hacer reaccionar con una cantidad aproximadamente equimolar de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos monoclonales de una segunda especie animal que se dirigen contra los fragmentos Fc de los anticuerpos de la primera especie animal. (Véase la Patente de los Estados Unidos N.º 4.868.109 concedida a Lansdorp, la cual se incorpora en el presente documento como referencia para una descripción de complejos de anticuerpo tetramérico y métodos para preparar los mismos).

65 En una realización, la composición comprende al menos dos complejos mono-específicos diferentes, uniéndose cada

uno a un antígeno diferente sobre los linfocitos T. En una realización, la composición comprende al menos dos complejos monoespecíficos solubles diferentes y cada uno de los al menos dos complejos monoespecíficos solubles diferentes se une a un antígeno diferente seleccionado del grupo que consiste en CD3, CD28, CD2, CD7, CD11a, CD26, CD27, CD30L, CD40L, OX-40, ICOS, GITR, CD137, y HLA-DR.

5 En una realización específica, un complejo monoespecífico se unirá a CD3 y el segundo complejo monoespecífico se unirá a CD28.

10 En otra realización, la composición comprende al menos tres complejos monoespecíficos solubles diferentes, uniéndose cada uno a uno de tres antígenos diferentes sobre los linfocitos T. En dicha realización, no se unirán dos complejos monoespecíficos al mismo antígeno.

15 En una realización específica, la composición comprende tres complejos monoespecíficos solubles diferentes, uno específico para CD3, un segundo específico para CD28 y un tercero específico para CD2.

En una realización específica, la activación de los linfocitos T en presencia de los complejos monoespecíficos solubles es mayor que la activación de los linfocitos T usando un complejo biespecífico que comprende dos proteínas de unión diferentes o anticuerpos, cada uno de los cuales se une a un antígeno diferente sobre los linfocitos T.

20 La muestra que contiene linfocitos T puede ser cualquier muestra en la que se desea activar los linfocitos T incluyendo, sin limitación, sangre completa, muestras de aféresis o células mononucleares de sangre periférica que contienen linfocitos T, linfocitos T humanos primarios purificados o líneas de linfocito T humano inmortalizado.

25 En una realización, la composición comprende al menos dos complejos monoespecíficos diferentes, uniéndose cada uno a un antígeno diferente sobre las células NK.

En una realización específica, un complejo monoespecífico se unirá a CD335 y el segundo complejo monoespecífico se unirá a CD2.

30 En otra realización, la composición comprende al menos dos complejos monoespecíficos solubles diferentes, uniéndose cada uno a uno de dos antígenos diferentes sobre las células NK. En dicha realización, no se unirán dos complejos monoespecíficos al mismo antígeno. En una realización, la composición comprende al menos dos complejos monoespecíficos solubles diferentes y cada uno de los al menos dos complejos monoespecíficos solubles diferentes se une a un antígeno diferente seleccionado del grupo que consiste en CD335, CD2, NKG2D, NKp44, NKp30, CD16, LFA-1 y CD27.

35 En una realización específica, la composición comprende dos complejos monoespecíficos solubles diferentes, uno específico para CD335, un segundo específico para CD2. En una realización, la composición comprende al menos un complejo monoespecífico soluble adicional específico para un antígeno seleccionado de NKG2D, NKp44, NKp30, CD16, LFA-1 y CD27.

En una realización específica, la activación de las células NK en presencia de los complejos monoespecíficos solubles es mayor que la activación de las células NK en ausencia de los complejos monoespecíficos solubles.

45 La muestra que contiene células NK puede ser cualquier muestra en la que se desea activar las células NK incluyendo, sin limitación, sangre completa, muestras de aféresis o células mononucleares de sangre periférica que contienen células NK, células NK humanas primarias purificadas o líneas de célula NK humana inmortalizada.

### Composición

50 La presente divulgación también incluye composiciones que comprenden al menos un complejo monoespecífico soluble, en las que el complejo monoespecífico soluble comprende dos proteínas de unión que se ligan y se unen al mismo antígeno sobre los linfocitos T o las células NK.

55 En otra realización, la composición comprende dos complejos monoespecíficos solubles, en la que un complejo monoespecífico soluble se une a un antígeno sobre los linfocitos T o las células NK y el segundo complejo monoespecífico soluble se une a un antígeno diferente sobre los linfocitos T o las células NK.

60 En otra realización, la composición comprende tres complejos monoespecíficos solubles, en la que cada complejo se une a un antígeno diferente sobre los linfocitos T. En una realización específica, los antígenos son CD3, CD28 y CD2.

En otra realización, la composición comprende dos complejos monoespecíficos solubles, en la que cada complejo se une a un antígeno diferente sobre las células NK. En una realización específica, los antígenos son CD335 y CD2.

65 **Usos**

La presente divulgación incluye todos los usos de los linfocitos T o células NK activados incluyendo, sin limitación, su uso en terapia.

5 Los métodos y las composiciones de la presente divulgación se pueden usar para expandir linfocitos T o células NK *ex vivo* para su uso *in vivo* en la terapia de cualquier enfermedad o afección que requiera linfocitos T o células NK incluyendo, sin limitación, inmunoterapia adoptiva de cáncer, infección patógena aguda o persistente (viral, fúngica, bacteriana, parásita), modulación de la eficacia de vacuna, o supresión inmunitaria de enfermedad autoinmune o injerto contra enfermedad del hospedador.

10 Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente divulgación:

**Ejemplo 1**

15 TAC para CD3 y TAC para CD28 mono-específicos inducen mayor proliferación en linfocitos T humanos en comparación con una mezcla de TAC para CD3/CD28 bio-específicos (Figura 1). Se prepararon TAC bio-específicos para CD3/CD28 mezclando primero volúmenes equivalentes de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Los TAC bio-específicos se formaron tras la adición de un volumen equivalente de anti-IgG1 de ratón de rata. La mezcla de TAC resultante contiene 25 % de TAC anti-CD3 mono-específicos, 25 % de TAC anti-CD28 mono-específicos y 50 % de TAC anti-CD3/anti-CD28 bio-específicos (Véase la Patente de los Estados Unidos N.º 4.868.109 concedida a Lansdorp, la cual se incorpora en el presente documento como referencia para una descripción de complejos de anticuerpo tetramérico y métodos para preparar los mismos).

20 Se preparó un cóctel mono-específico de TAC para CD3 y TAC para CD28 mezclando volúmenes equivalentes de o bien anticuerpos anti-CD3 o anti-CD28 con un volumen equivalente de anti-IgG1 de ratón de rata. Los TAC mono-específicos resultantes se mezclaron a una proporción 1:1 para preparar un cóctel de TAC mono-específico para CD3 y CD28 compuesto de 50 % de TAC anti-CD3 y 50 % de TAC anti-CD28.

25 Se enriquecieron linfocitos T humanos de sangre completa humana fresca mediante enriquecimiento negativo usando RosetteSep™ (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canadá). Se marcaron linfocitos T CD4+ enriquecidos con una concentración final de 1 µM CFDA-SE. Tras el marcaje, los linfocitos T marcados con CFSE se resuspendieron en medio XVIVO-15 (Lonza, Basel, Suiza).

30 Se bloquearon placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos con albúmina de suero humano (HSA) al 1 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante una noche a 4 °C. En los pocillos bloqueados con HSA al 1 %, se cultivaron células marcadas con CFSE en presencia de 0,5 µg/ml final de o bien TAC para CD3 y CD28 mono-específicos o con TAC bio-específicos para CD3/CD28. No se añadió IL-2 exógena a los cultivos. Las muestras se cultivaron durante 7 días en una incubadora a 37 °C humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. Tras 7 días en cultivo, en las muestras se evaluó por citometría de flujo la dilución de colorante CFSE (un indicador de la proliferación celular) y la expresión de CD4 y CD8.

35 Los resultados demuestran que los TAC para CD3 y CD28 mono-específicos inducen mayor proliferación de linfocitos T CD4+ y CD8+ en comparación con los TAC para CD3/CD28 bio-específicos. Linfocitos T CD4+ y CD8+ no estimulados se sometieron a proliferación mínima, 1,2 % y 1,5 %, respectivamente. El 54,7 % de los linfocitos T CD4+ estimulados con TAC mono-específicos proliferaron en comparación con el 27,4 % con TAC bio-específicos. El 33,0 % de los linfocitos T CD8+ estimulados con TAC mono-específicos proliferaron en comparación con el 15,9 % con TAC bio-específicos. Los resultados indican que los TAC mono-específicos solos son capaces de inducir la proliferación de linfocitos T y que una mezcla que contiene 25 % de TAC para CD3 y CD28 mono-específicos y 50 % de TAC bio-específicos es menos eficaz en la inducción de la proliferación de linfocitos T evaluada por la dilución de colorante CFSE tras 7 días en cultivo.

50 **Ejemplo 2**

TAC para CD2 mono-específico soluble en combinación con TAC para CD3 y CD28 induce activación óptima de los linfocitos T humanos (Figura 2). Se prepararon TAC mono-específicos como se describe en el ejemplo 1. Se prepararon TAC mono-específicos específicos para anti-CD3 usando anti-CD3 humana. Se prepararon TAC anti-CD28 mono-específicos usando anti-CD28 humana. Se prepararon TAC anti-CD2 mono-específicos usando anti-CD2 humana. Se cultivaron linfocitos T humanos purificados marcados con CFSE con diversas combinaciones de TAC mono-específicos o con perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® en placas de 96 pocillos dejadas sin tratar o bloqueadas con HSA al 1 %. El efecto combinatorio de: i) TAC anti-CD3 solo, ii) TAC anti-CD3 y TAC anti-CD28 o iii) TAC anti-CD3, TAC anti-CD28 y TAC anti-CD2 sobre la proliferación de linfocito T (dilución de colorante CFSE) se evaluó por citometría de flujo después de 3 días en cultivo en medio XVIVO-15. Los recuentos celulares viables se realizaron usando un ensayo con Guava ViaCount los días 6 de cultivo.

65 Antes de cultivar las células, los pocillos de las placas de cultivo de tejido de 96 pocillos o bien se dejaron sin tratar o se bloquearon con HSA al 1 % en PBS durante una noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron con PBS antes de cultivar las células. La HSA impidió la inmovilización de los complejos de anticuerpo en el plástico de cultivo de tejido asegurando que la estimulación es mediada por TAC soluble en suspensión.

Las perlas CD3/CD28 activadoras T humano Dynabead® (muestras n.º 5 y n.º 10) no están afectadas por el pretratamiento de pocillo e inducen altos niveles de proliferación de tanto linfocito T CD4+ como CD8+. Las células viables totales en el día 6 son similares entre los tratamientos de placa cuando se usan Dynabeads® para la expansión de los linfocitos T. TAC para CD3 solo no es suficiente para inducir la expansión de los linfocitos T (Muestras n.º 2 y n.º 6); mientras que, la combinación de TAC monoespecífico para CD3 y CD28 puede inducir altos niveles de proliferación de los linfocitos T cuando los pocillos se dejan sin tratar (Muestra n.º 3). Cuando se usan TAC para CD3 y CD28 en pocillos bloqueados con HSA al 1 % (Muestra n.º 8), la proliferación de los linfocitos T se reduce significativamente con células viables totales en el día 6 reducidas de 1,09E6 a 2,46E5 células cuando se compara con los pocillos sin tratar con el mismo estímulo. Por el contrario, la combinación de TAC monoespecífico para CD3, CD28 y CD2 fue mínimamente afectada por el bloqueo del pocillo con HSA (Muestras n.º 4 y n.º 9) similar a las perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead®. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la inmovilización en placa de TAC monoespecífico para CD3 y CD28 influye en su eficacia en la activación de los linfocitos T. Sin embargo, si la combinación de TAC monoespecífico para CD3, CD28 y CD2 se usa para estimular los linfocitos T, esto sucede independiente de la inmovilización en placa y la función del TAC monoespecífico de una manera soluble. Las perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® tampoco están afectadas por el pretratamiento de placa ya que los anticuerpos anti-CD3 y CD28 se inmovilizan en la superficie de la perla.

### Ejemplo 3

TAC para CD3, CD28 y CD2 monoespecífico soluble puede inducir la producción de citoquina mediante linfocitos T (Figura 3). Se cultivaron linfocitos T humanos enriquecidos con RosetteSep™ durante 4 horas en presencia de diversas combinaciones de construcciones de TAC monoespecífico soluble o perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® (Figura 3). Se añadió Brefeldin A a los cultivos para permitir la acumulación de citoquina intracelular y la evaluación por citometría de flujo tras el cultivo. Los cultivos se recogieron y se tiñeron para los marcadores de superficie celular y las citoquinas intracelulares tras la fijación y permeabilización.

Los resultados demuestran que TAC para CD3 solo no induce ni la producción de IL-2 ni de IFN $\gamma$  en los linfocitos T tras 4 horas de estimulación (Muestra n.º 1). La combinación de TAC para CD3 y CD28 induce que 2,4 % y 2,45 % de los linfocitos T CD4+ y CD8+ produzcan IL-2, respectivamente (Muestra n.º 2). El TAC para CD3 y CD28 también indujo que 0,5 % de los linfocitos T CD4+ y 1,0 % de los linfocitos T CD8+ produjeran IFN $\gamma$ . La combinación de TAC monoespecífico para CD3, CD28 y CD2 indujo mayores niveles de producción de IL-2 y IFN $\gamma$  por los linfocitos T en comparación con TAC para CD3 y CD28 solo (Muestra n.º 3). Las perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® indujeron niveles similares de IL-2 que la combinación de CD3, CD28 y CD2 pero indujeron mayores niveles de IFN $\gamma$  (Muestra n.º 4). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que la combinación de TAC monoespecífico para CD3, CD28 y CD2 puede inducir mayores niveles de producción de citoquina por los linfocitos T CD4+ y CD8+ en comparación con TAC para CD3 y CD28 solo; mientras que las perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® inducen mayores niveles de IFN $\gamma$ . IL-2 ayuda en la inducción de la proliferación y diferenciación de los linfocitos T mientras que IFN $\gamma$  es una citoquina efectora implicada en la inducción de una respuesta inmunitaria antiviral.

### Ejemplo 4

Imágenes representativas (aumento 10X y 20X) de linfocitos T estimulados con TAC monoespecífico para CD3, CD28 y CD2 en comparación con linfocitos T estimulados con perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® durante el transcurso de 21 días (Figura 4). Se cultivaron linfocitos T humanos enriquecidos con EasySep™ con o bien perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® a una proporción de perla y célula 1:1, o con 0,5  $\mu$ g/ml final de TAC monoespecífico para CD3, CD28 y CD2 en presencia de 30 U/ml de IL-2 humana recombinante. Se hizo un seguimiento del crecimiento celular en los cultivos y la concentración celular se mantuvo a 0,5 - 2x10E6 células/ml. Los linfocitos T se volvieron a estimular el día 7 y el 17 de cultivo con perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® o TAC para CD3, CD28 y CD2 monoespecífico.

Los cultivos estimulados con perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® y TAC para CD3, CD28 y CD2 monoespecífico inducen características similares de proliferación y expansión de linfocitos T. Las perlas de 4,5  $\mu$ m usadas en las perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® se pueden ver claramente en los cultivos. A diferencia de las perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead®, los cultivos estimulados con TAC no requieren de la retirada de las perlas antes de cualquier ensayo funcional posterior ya que las perlas de tamaño de célula pueden interferir con el análisis posterior tal como la citometría de flujo.

### Ejemplo 5

Cultivo a largo plazo y expansión de los linfocitos T humanos con perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® en comparación con TAC monoespecífico para CD3, CD28 y CD2 (Figura 5). Se cultivaron 1x10E6 linfocitos T humanos enriquecidos con EasySep™ con o bien perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® a una proporción de perla y célula 1:1, o con 0,5  $\mu$ g/ml final de TAC monoespecíficos para CD3, CD28 y CD2 en presencia de 30 U/ml de IL-2 humana recombinante. Se hizo un seguimiento del crecimiento celular en los cultivos y

la concentración celular se mantuvo a 0,5 - 2x10<sup>6</sup> células/ml. Los linfocitos T se volvieron a estimular el día 7 y el 17 de cultivo con perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® o TAC para CD3, CD28 y CD2 mono-específico y se reemplazó el medio con medio fresco a intervalos regulares.

- 5 El día 0, se cultivaron en placa 1x10<sup>6</sup> linfocitos T enriquecidos con EasySep™ en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos y se estimularon con perlas CD3/CD28 activadoras de T humano Dynabead® o TAC para CD3, CD28 y CD2 mono-específico. Se recontaron las células totales y las células viables usando un hemocitómetro con azul de tripano en los momentos indicados. Los resultados demuestran que los cultivos estimulados con TAC dieron como resultado expansión de linfocitos T totales incrementada y linfocitos T viables tras 21 días en cultivo.

10

### Ejemplo 6

- 15 Se aislaron células NK humanas mediante enriquecimiento negativo usando el kit de aislamiento de célula NK humana EasySep (STEMCELL Technologies, N.º de Cat. 17955). Se cultivaron células NK aisladas (CD45+ CD3- CD56+) en medio ImmunoCult-XF sin suero y xeno (STEMCELL Technologies, N.º de Cat. 10981) complementado con 500 UI/ml de IL-2 humana recombinante a una densidad celular de 1x10<sup>6</sup> células/ml. Las células NK o bien no recibieron estímulo adicional (no estimulación) o se estimularon con complejos TAC mono-específicos CD335/CD2 a una concentración final de 0,5 ug/ml de cada anticuerpo. El día 3, 6, 8, 10 y 13, se recontaron las células viables totales usando un Nucleocounter y se evaluó la pureza de célula NK por citometría de flujo. Los cultivos se mantuvieron a aproximadamente 1x10<sup>6</sup> células/ml con la adición de medio ImmunoCult-XF fresco complementado con 500 UI/ml de IL-2.

- 20 Como se muestra en la Figura 6A, las células NK aisladas usando EasySep y mantenidas en medio ImmunoCult-XF complementado con IL-2 incrementaron en pureza desde el 84,5 % al 94 % desde el día 0 al día 6 independientemente de si recibieron algún estímulo adicional. La pureza de las células NK se mantuvo a un nivel similar hasta el día 13 de cultivo.

- 25 Como se muestra en la Figura 6B, las células NK estimuladas con complejos TAC CD335/CD2 mono-específicos incrementaron en número celular entre el día 8 y el día 10 y continuaron hasta el día 13 momento en el que hubo un incremento de 1,72 veces en el número de células NK en los cultivos estimulados con CD335/CD2.

- 30 Aunque la presente divulgación se ha descrito en referencia a lo que se consideran actualmente que son los ejemplos preferidos, debe entenderse que la divulgación no se limita a los ejemplos desvelados.

### 35 Citas completas de las referencias citadas en la memoria descriptiva

- Dixon, J. F. P., Law, J. L., and Favero, J. J. (1989). "Activation of Human T Lymphocytes by Crosslinking of Anti-CD3 Monoclonal Antibodies". *Journal of Leukocyte Biology* 46: 214-220.
- 40 Baroja, M. L., Lorre, K, Van Vaeck, F., and Ceuppens, J. L. (1989). "The Anti-T Cell Monoclonal Antibody 9.3 (Anti-CD28) Provides a Helper Signal and Bypasses the Need for Accessory Cells in T Cell Activation with Immobilized Anti-CD3 and Mitogens". *Cellular Immunology* 120: 205-217.
- 45 Smith-Garvin, J. E., Koretzkey, G. A., and Jordan, M. S. (2009). "T Cell Activation". *Annual Review of Immunology* 27: 591-619.
- Kruisbeek, A. M., Shevach, E., and Thornton, A. M. (2004). "Proliferative Assays for T Cell Function". *Current Protocols in Immunology* 3.12.1 - 3.12.20.
- 50 Morrison et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 81,6851 (1985).
- Takeda et al., *Nature* 314, 452 (1985).
- 55 Wacholtz et al., *J. Immunol.* 142(12), 4201-4212 (1989).
- Geppert et al., *J. Immunol.* 140(7), 2155-2164 (1988).
- Lansdorp et al., *Eur. J. Immunol.* 16(6), 679-683 (1986).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de activación de linfocitos T o células NK que comprende cultivar una muestra que contiene linfocitos T o células NK con una composición que comprende al menos un complejo mono-específico soluble, en donde cada complejo mono-específico soluble comprende dos proteínas de unión que se ligan y se unen al mismo antígeno sobre los linfocitos T y las células NK, y en donde el antígeno sobre los linfocitos T o las células NK es cualquier antígeno que activa dichos linfocitos T o células NK.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la composición comprende al menos dos complejos de anticuerpo mono-específicos diferentes, en donde un complejo de anticuerpo mono-específico se une a un primer antígeno sobre los linfocitos T o las células NK que activa dichos linfocitos T o células NK y el otro complejo de anticuerpo mono-específico se une a un segundo antígeno sobre los linfocitos T o las células NK que activa dichos linfocitos T o células NK.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que la composición comprende al menos tres complejos de anticuerpo mono-específicos diferentes, en donde el primer complejo de anticuerpo mono-específico se une a un primer antígeno que activa dichos linfocitos T o células NK, el segundo complejo de anticuerpo mono-específico se une a un segundo antígeno que activa dichos linfocitos T o células NK y el tercer complejo de anticuerpo mono-específico se une a un tercer antígeno sobre los linfocitos T o las células NK que activa dichos linfocitos T o células NK.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- (i) el o cada antígeno sobre los linfocitos T se selecciona independientemente del grupo que consiste en CD3, CD28, CD2, C7, CD11a, CD26, CD27, CD30L, CD40L, OX-40, ICOS, GITR, CD137 y HLA-DR; o
- 25 ii) el o cada antígeno sobre las células NK se selecciona independientemente del grupo que consiste en CD335, CD2, NKG2D, NKp44, NKp30, CD16, LFA-1 y CD27.
- 30 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que las proteínas de unión son anticuerpos o fragmentos de los mismos y opcionalmente en donde los complejos mono-específicos solubles son complejos de anticuerpo tetramérico.
- 35 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5 en el que los complejos de anticuerpo tetramérico (TAC) están compuestos de dos anticuerpos de una especie unidos por dos moléculas de anticuerpo de una segunda especie que se une a la parte Fc de los anticuerpos de la primera especie animal.
- 40 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 para activar los linfocitos T, en el que un complejo de anticuerpo mono-específico se une a un primer antígeno sobre los linfocitos T y el otro complejo de anticuerpo mono-específico se une a un segundo antígeno sobre los linfocitos T.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7 en el que el primer antígeno es CD3.
9. El método de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 en el que el segundo antígeno es CD28.
- 45 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en el que el tercer antígeno es CD2.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que la activación de linfocitos T es una o más de la proliferación de linfocito T aumentada, producción de citoquina aumentada o expansión de linfocito T aumentada.
- 50 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 para activar las células NK, en el que un complejo de anticuerpo mono-específico se une a un primer antígeno sobre las células NK y el otro complejo de anticuerpo mono-específico se une a un segundo antígeno sobre las células NK.
- 55 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12 en el que el primer antígeno es CD335.
14. El método de acuerdo con las reivindicaciones 12 u 13 en el que el segundo antígeno es CD2.
- 60 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 12 a 14, en el que la activación de las células NK es una o más de la proliferación de célula NK aumentada, producción de citoquina aumentada o expansión de célula NK aumentada.
16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en el que los linfocitos T o las células NK son humanas.

FIGURA 1

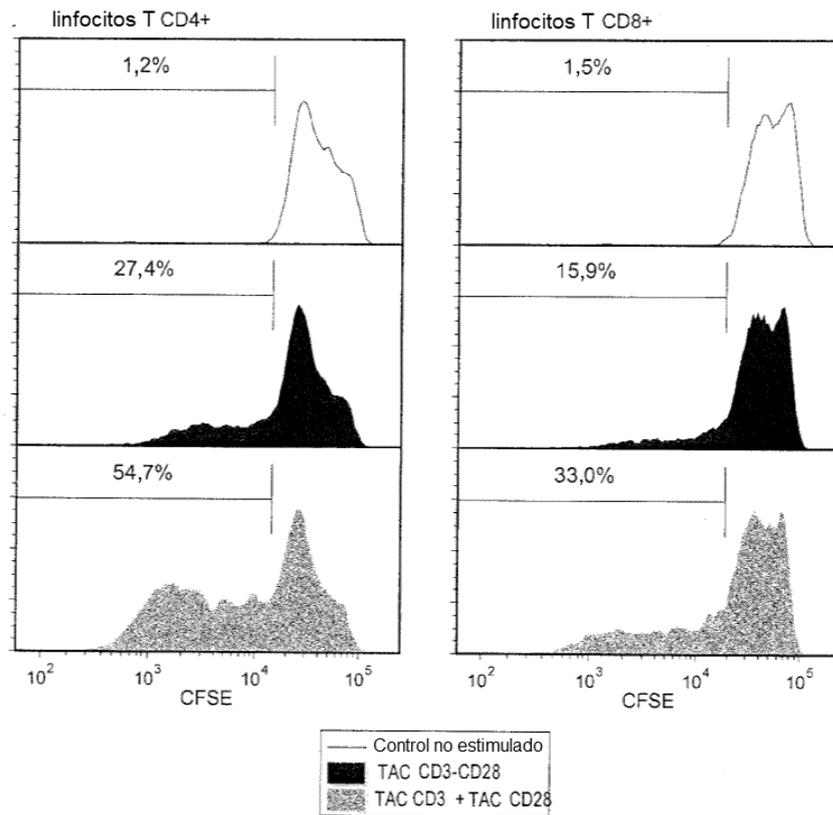


FIGURA 2

n.º muestra	Pretratamiento pocillo	Estímulo activación linfocito T (TAC o Dynabeads)	Final [TAC] (ug/ml)	Proporción Dynabead y célula	%CD8+ dividido (día 3)	%CD4+ dividido (día 3)	Células totales viables (día 6)
1	-	No estimulada	-	-	0,74	1,06	3,17E+04
2	-	CD3	0,5	-	11,67	7,4	7,71E+04
3	-	CD3 + CD28.2	0,5	-	78,09	66,26	1,09E+06
4	-	CD3 + CD28.2 + CD2	0,5	-	71,88	55,28	1,03E+06
5	-	CD3/CD28 Dynabeads	-	3:1	90,08	81,01	1,53E+06
6	1% HSA	No estimulada	-	-	0,87	1,01	5,45E+03
7	1% HSA	CD3	0,5	-	1,3	1,07	3,83E+02
8	1% HSA	CD3 + CD28.2	0,5	-	39,68	33,24	2,46E+05
9	1% HSA	CD3 + CD28.2 + CD2	0,5	-	60,56	47,42	9,63E+05
10	1% HSA	CD3/CD28 Dynabeads	-	3:1	90,98	83,53	1,11E+06

FIGURA 3

n.º muestra	Estimulo activación linfocito T (TAC o Dynabeads)	Final [TAC] (ug/ml)	Proporción Dynabead y célula		%CD4+		%CD8+	
			IL-2+	IFNg+	IL-2+	IFNg+	IL-2+	IFNg+
1	CD3	0,5	-	-	0,02	0,15	0,1	0,34
2	CD3 + CD28	0,5	-	-	2,4	0,5	2,45	1
3	CD3 + CD28 + CD2	0,5	-	-	3,81	0,86	3,48	1,23
4	CD3/CD28 Dynabeads	-	3:1	-	3,87	1,95	4,04	3,43

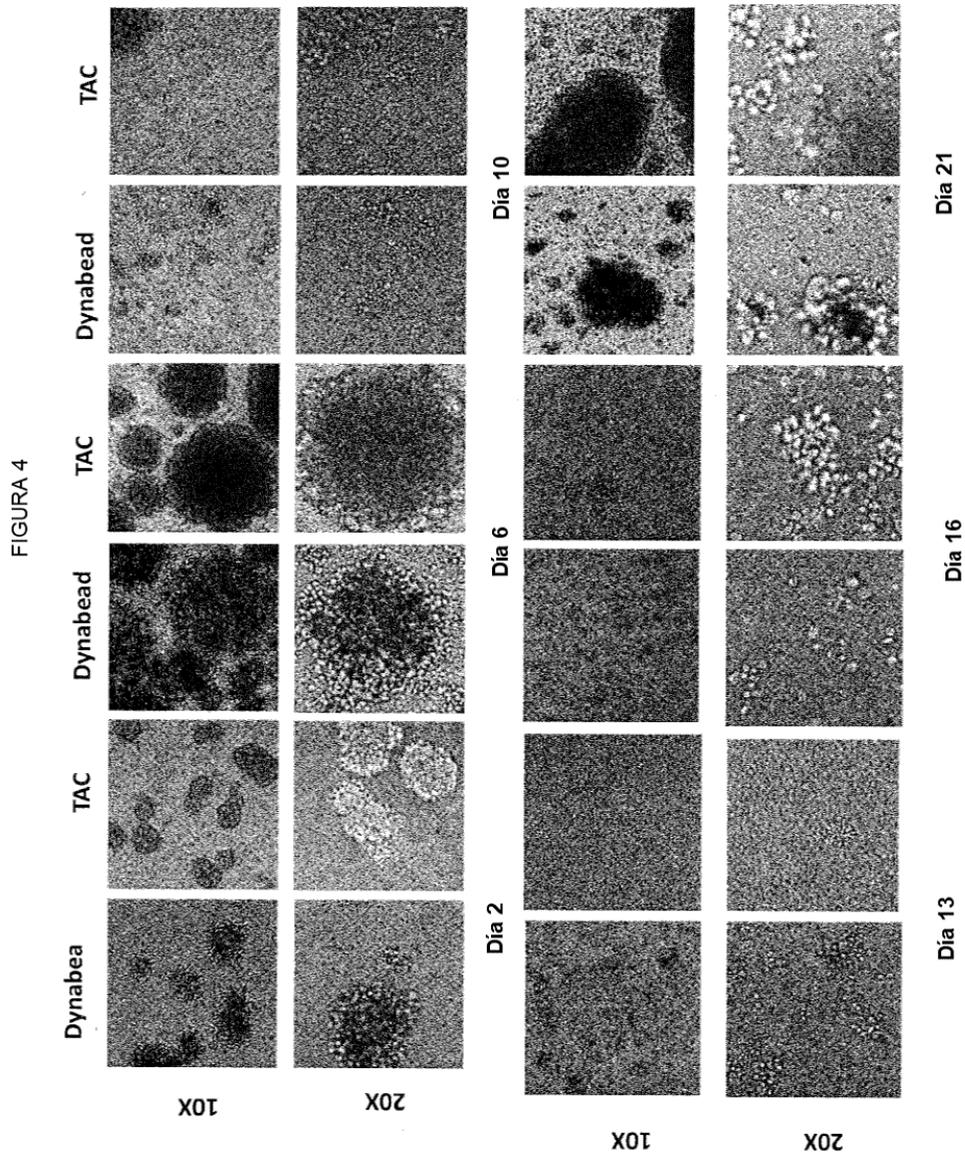


FIGURA 5

Comparación de expansión de linfocito T humano entre Dynabeads CD3/CD28 y TAC CD3, CD28 y CD2 monoespecíficos solubles

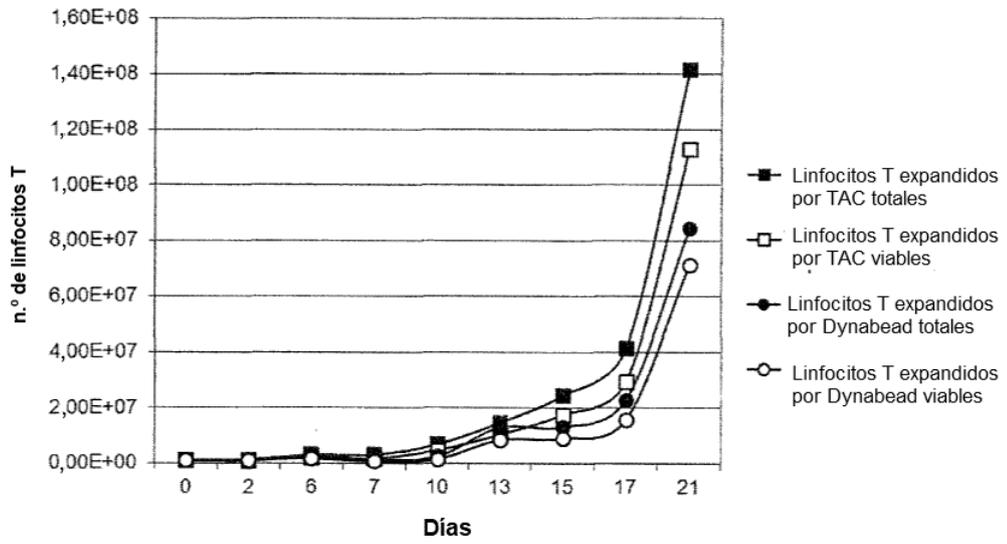


FIGURA 6A

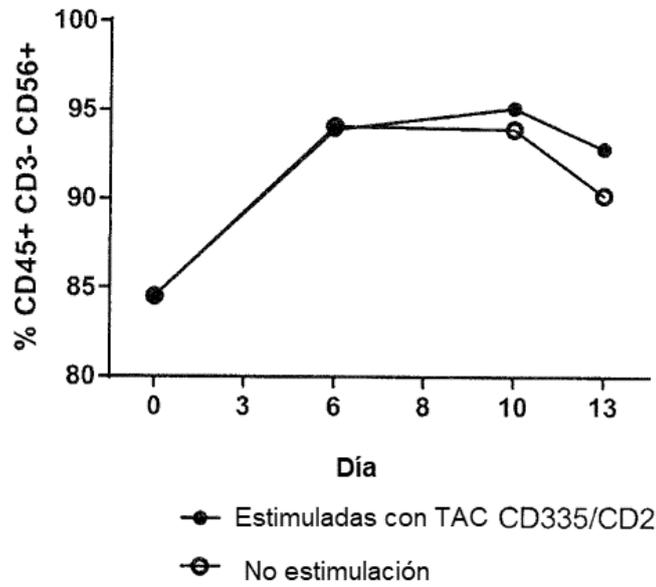


FIGURA 6B

