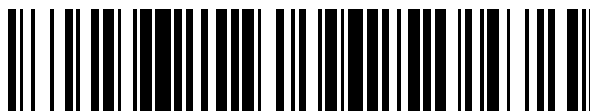


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 504**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08102851 .6**

96 Fecha de presentación: **03.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1956080**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2008**

54 Título: **USO DE IL-7 E IL-15 PARA LA MODIFICACIÓN DE LOS LINFOCITOS T DE MEMORIA.**

30 Prioridad:
08.08.2005 US 706503 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2012

73 Titular/es:
**FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL
MONTE TABOR
VIA OLGETTINA, 60
20132 MILANO, IT**

72 Inventor/es:
**Bonini, Maria Chiara y
Bondanza, Attilio**

74 Agente: **Campello Estebaran, Reyes**

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).

ES 2 374 504 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de IL-7 e IL-15 para la modificación genética de los linfocitos T de memoria

INTRODUCCIÓN

El repertorio de células T con especificidad de antígeno (Ag) está estrechamente regulado por mecanismos homeostáticos que aseguran su persistencia y funcionalidad incluso en ausencia del antígeno. Después de encontrarse con un Ag, las células T naíf sufren una expansión clonal rápida y se diferencian en células T efectoras (1, 2). La duración de vida de las células T efectoras está limitada por la muerte celular que puede ocurrir después de encontrar un Ag adicional (muerte celular inducida por activación) o debido a la ausencia de factores de supervivencia. Durante una respuesta inmune, se generan también células T de memoria. Las células T de memoria pueden sobrevivir durante toda la vida, proporcionando así una protección de larga duración contra los patógenos de recuerdo (3). Las frecuencias de células T de memoria con especificidad de antígeno en la mayoría de las muestras biológicas, sin embargo, siguen siendo inferiores al límite de detección de los ensayos de tinción del tetrámero Ag/MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) y ensayos funcionales, tales como la tinción de citoquinas intracelulares y ELISpot (4, 5). Las células T CD4⁺ con especificidad de Ag en particular son en su mayoría indetectables *ex vivo* y por consiguiente se analizan después de tandas múltiples de expansión de las células T *in vitro* impulsada por Ag. La reestimulación *in vitro*, sin embargo, favorece probablemente la diferenciación terminal de las células, dificultando su supervivencia a largo plazo. Como consecuencia, las células T re-estimuladas por Ag *in vitro* podrían exhibir también un fenotipo no totalmente representativo del encontrado *in vivo*. Por estas razones, son necesarias estrategias alternativas que mejoren la detección *ex vivo* de las células T con especificidad de Ag a fin de caracterizar mejor las respuestas inmunes en curso, y evaluar la inmunocompetencia de pacientes con trastornos relacionados con la inmunidad.

Varios estudios han demostrado que el establecimiento y el mantenimiento de la memoria de las células T están controlados por señales dirigidas asociadas con las células (complejo Ag/MHC) y solubles (citoquinas) (3, 6, 7). El disparo del TCR por complejos Ag/MHC propios y extraños regula la transición de las células naíf a células de memoria, la supervivencia y la proliferación de las células de memoria. El conjunto de linfocitos de memoria es posiblemente muy heterogéneo. Recientemente, se han identificado dos tipos de células T de memoria: las células T de memoria efectoras (CD45RA⁺, CCR7⁻, CD62L⁻) y las células T de memoria central que son células CD45RA negativas caracterizadas por la expresión de CCR7 y CD62L, dos moléculas requeridas para el asentamiento en áreas de células T de órganos linfoides secundarios. Después de la estimulación con un antígeno, las células T de memoria central producen niveles bajos de citoquinas efectoras tales como IL-4 e IFN- γ , pero niveles altos de IL-2, que es capaz de sostener su proliferación rápida y consistente. Después de encontrarse con un antígeno, las células T de memoria central experimentan: 1) proliferación, dando como resultado un proceso auto-regenerativo, encaminado a aumentar su reserva, y 2) diferenciación, que da como resultado la generación de células T de memoria efectoras, que se caracterizan por un bajo potencial proliferativo pero son capaces de migrar a tejidos inflamados no linfoides y mediar la fase efectora de la respuesta inmune (8). La retirada del Ag es crítica para evitar una estimulación excesiva del TCR y la muerte celular inducida por activación, y para la generación de células T de memoria central. La homeostasis apropiada de las células T está asegurada por citoquinas que regulan estrechamente la supervivencia, proliferación y apoptosis de los linfocitos T humanos y murinos. Entre los factores solubles, las citoquinas comunes de fijación de la cadena y tales como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 promueven la supervivencia celular y la proliferación homeostática (2). En particular, IL-2 sostiene a la vez la proliferación de las células T y la apoptosis después del encuentro con un antígeno. Las señales generadas por TCR y por IL-7 controlan la proliferación y supervivencia de las células naíf y de memoria (7, 9-14). En ausencia de intervención del TCR, IL-7 hace las células T CD4⁺ maduras humanas naíf y de memoria menos susceptibles a la muerte celular inducida por Fas (15). Además, por inducir la regulación creciente de Bcl-2, favorece la transición de las células T CD4⁺ con experiencia de Ag a células de memoria en reposo (9, 11). Finalmente, IL-15 combina una actividad anti-apoptótica con un efecto consistente de promoción de la proliferación de células T naíf y de memoria (16). Por estas razones, las citoquinas de fijación de la cadena y comunes han sido utilizadas con anterioridad en combinación con la expansión de las células dirigida por Ag para el mantenimiento y la expansión *in vitro* de líneas de células T con especificidad de Ag. En algunos casos se utilizaron también citoquinas comunes de fijación de la cadena para mejorar la detección de células T con especificidad de Ag.

La publicación de patente de los Estados Unidos US2005/0074822 se refiere a un método de detección de una población de células T con especificidad de antígeno en el cual las células se exponen al antígeno en presencia de citoquinas comunes de fijación de la cadena. Este método no permite la expansión, o el enriquecimiento, de células de memoria con especificidad de Ag.

Varios documentos (44-49) describen la activación de linfocitos con baCD3/CD28 y sus exposición a IL-2 y/o IL-7 dentro del contexto de la transducción de células T.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Modelo 3. Esta invención está basada en el concepto de que las células de memoria central, después del disparo del TCR en presencia de co-estimulación y cultivo con gamma-citoquinas, pueden expandirse *in vitro* y ser modificadas genéticamente por un vector viral, en tanto que mantienen sus fenotipos funcionales.

Se cree que la terapia celular con linfocitos T tiene un enorme potencial para curar cánceres, infecciones, inmunodeficiencias y autoinmunidad. Además, la misma puede utilizarse para modular las respuestas inmunes que se producen en el contexto del trasplante. La modificación genética está orientada a ensanchar el intervalo terapéutico de los linfocitos T por aumento de su eficacia y/o limitación de su toxicidad. Esto se consigue por la transferencia de genes que codifican nuevos receptores, productos biológicamente activos, factores de resistencia y de control. Se espera que los factores de control proporcionen eliminación/desactivación selectivas *in vivo* de células modificadas genéticamente si sobreviene un efecto tóxico/indeseable. La terapia con genes suicidas en el contexto del trasplante alogénico de células hematopoyéticas (alo-HCT) es el ejemplo más claro del modo en que la modificación genética de células T con un factor de control logra un beneficio terapéutico. En la alo-HCT, el reconocimiento inmune de antígenos del hospedador por las células T del donante es un arma "de doble filo", que conduce a efectos beneficiosos específicos: las células T 1) median un efecto antitumoral directo (injerto-frente a-leucemia-GvL); 2) promueven el injerto de precursores hematopoyéticos; 3) proporcionan un sistema inmune intacto a los pacientes trasplantados, haciendo así posible que remitan la incidencia y la gravedad de las infecciones post-trasplante. Lamentablemente, las células T del donante pueden reaccionar también contra los tejidos sanos del hospedador, conduciendo así a la enfermedad de rechazo inverso (la GvHD), amenazante para la vida (20). La modificación genética de las células T con un vector retroviral que expresa el gen suicida de la timidina-quinasa (TK) del Virus del Herpes Simplex confiere sensibilidad selectiva al pro-fármaco ganciclovir (GCV). En los pacientes, la infusión de linfocitos TK⁺ y la administración subsiguiente de GCV dieron como resultado una modulación a lo largo del tiempo de la reactividad anti-hospedador para la preservación de los beneficios de las células T, y un control selectivo de la GvHD (21-23).

El éxito de la terapia con células T y la terapia génica con células T depende de la capacidad de las células T para proliferar y sobrevivir a largo plazo *in vivo*. Para alcanzar esta meta, las células T necesitan asentarse adecuadamente en órganos linfoides secundarios, donde ocurre el encuentro apropiado con el antígeno e induce las células T a adquirir funciones efectoras. Está siendo cada vez más reconocido que estos atributos tienden a segregarse en etapas precoces de la diferenciación de las células T maduras, y en particular en el compartimiento de la memoria central. La modificación genética con vectores virales puede alterar la fisiología de las células T. En particular, la modificación genética por vectores retrovirales (RV) requiere proliferación celular. Esto se consigue corrientemente por activación con estímulos policlonales y cultivo en presencia de dosis altas de IL-2 humana recombinante. Los inventores han encontrado que los linfocitos T humanos modificados genéticamente, generados con los protocolos corrientes, es decir la activación con anticuerpos solubles anti-CD3 y cultivo en presencia de IL-2, son principalmente células de memoria efectoras, que exhiben fácilmente funciones efectoras *in vivo* pero que se injertan deficientemente en los hospedadores condicionados por inmunodeficiencia. Dado que la expansión y persistencia de las células T humanas es un requisito previo crucial para una terapia génica eficaz basada en células T, la presente invención proporciona un método de cultivo y transducción de células T aptas para generar células T de memoria central modificadas genéticamente. Para este propósito, los inventores combinaron:

- activación de células T con cuentas conjugadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28
- cultivo con IL-7 e IL-15 a dosis bajas
- transducción con un vector retroviral.

Los resultados indican que la producción de linfocitos modificados génicamente con cuentas en presencia de IL-7 e IL-15 es factible y que estas células tienen una ratio fisiológica CD4/CD8 y un fenotipo funcional de memoria central, definido por i) una ausencia de expresión de CD45RA y presencia de expresión de CD62L, ii) una co-expresión de las moléculas CD27 y CD28 y iii) una producción de IL-2 en ausencia de IFN- γ y/o IL-4.

Adicionalmente, los inventores observaron que las células T de memoria central modificadas genéticamente infundidas en hospedadores condicionados por inmunodeficiencia i) se injertan y expanden a niveles significativamente más altos que las células T efectoras de memoria modificadas genéticamente, y ii) son más potentes que los linfocitos efectores de memoria para inducir una respuesta inmune a los antígenos hospedadores.

Estos resultados demuestran que pueden obtenerse linfocitos recombinantes plenamente funcionales de memoria central y aprovecharse para la curación de enfermedades humanas.

En la presente invención, el término linfocitos recombinantes plenamente funcionales de memoria central significa, células T de memoria central con potencial de supervivencia a largo plazo, capaces de asentarse en órganos periféricos linfoides, y diferenciarse en células efectoras después del reencuentro con el antígeno *in vivo*.

El objeto de la invención es un método in vitro para obtener una población de células T de memoria modificadas genéticamente, que comprende los pasos de:

a) activar linfocitos con al menos dos anticuerpos agonistas de receptores de activación específicos en los cuales uno de los anticuerpos agonistas de receptores de activación de linfocitos es específico para el polipéptido CD3, y el otro anticuerpo agonista de receptores de activación de linfocitos es específico para CD28;

b) exponer los linfocitos activados a una cantidad eficaz de al menos IL-7 e IL-15, capaz de expandir selectivamente poblaciones de células T de memoria;

c) insertar y expresar un gen exógeno por medio de un vector apropiado en las células obtenidas en b).

Preferiblemente, las poblaciones de células T de memoria comprenden poblaciones de células T CD4⁺ y/o CD8⁺ y/o γδ, y/o NKT.

Preferiblemente, los linfocitos se derivan de una muestra biológica perteneciente al grupo de: muestras de sangre y otro líquido de origen biológico, muestras de tejido sólido, cultivos de tejido de células derivadas de los mismos y la progenie de los mismos, células aisladas de muestras biológicas como, por ejemplo, PBMCs. Preferiblemente, el agonista receptor específico de activación de los linfocitos está conjugado a soportes que mimetizan células, siendo más preferiblemente los soportes que mimetizan células cuentas paramagnéticas.

En una realización preferida, el vector es un vector viral.

En una realización preferida, el gen exógeno codifica un gen suicida, y/o un gen marcador, y/o una molécula biológicamente activa, y/o un receptor, y/o un factor soluble retenido en la célula o liberado al exterior de la célula, y/o un gen que confiere resistencia a un profármaco.

La invención se describirá a continuación por medio de ejemplos no limitantes, haciendo referencia a las figuras siguientes:

FIGURA 27. La activación con cuentas conjugadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (baCD3/CD28) y el cultivo con IL-7 e IL-15 promueven la expansión de las células T y generan eficientemente linfocitos humanos modificados genéticamente con una ratio CD4/CD8 preservada. Se estimularon 5×10^6 PBMC con aCD3 y se cultivaron con IL-2 o con baCD3/CD28 y se cultivaron con IL-7 e IL-15. El día 14, se contaron las células por exclusión con Azul Tripán. (A) Se consignan los valores medios de multiplicidad de expansión de las células T en las dos condiciones de estimulación y cultivo ($n = 4$ donantes). 48 horas y 72 horas después de la estimulación inicial, se sometieron las células a transducción por el vector retroviral SFCMM3. El día 6, las células modificadas genéticamente se cuantificaron por citometría de flujo después de tinción con anticuerpos anti-LNGFR. (B) Se consignan los valores medios de eficiencia de transducción (en %) en las dos condiciones de estimulación y cultivo ($n = 4$ donantes). El día 14, las células se analizaron por citometría de flujo para expresión de ΔLNGFR y para la expresión de CD4 y CD8. (C) Se consignan los valores medios de la ratio CD4/CD8 en las células genéticamente modificadas generadas con los dos protocolos ($n = 4$ donantes).

FIGURA 28. La activación con baCD3/CD28 y el cultivo con IL-7 e IL-8 generan linfocitos humanos TK⁺ con fenotipo de memoria central. El día 14, las células TK⁺ generadas con aCD3 y cultivadas con IL-2 o generadas con baCD3/CD28 y cultivadas con IL-7 e IL-15 se analizaron respecto a fenotipo de memoria. Después de selección respecto a la expresión de ΔLNGFR, se analizaron las células por citometría de flujo respecto a la co-expresión de CD45RA y CD62L. Se consignan los valores medios de la distribución relativa (eje y, %) de CD45RA⁺CD62L⁺ (barras negras), CD45RA⁺CD62L⁻ (barras grises oscuras), CD45RA⁻CD62L⁻ (barras grises claras) o CD45RA⁻CD62L⁺ (barras blancas) (A) para las células CD4⁺ y (B) para las células CD8⁺ obtenidas de $n = 4$ donantes. Se analizaron también las células por citometría de flujo respecto a la co-expresión de CD27 y CD28. Se consignan los valores medios de la distribución relativa (eje y, %) de CD28⁺CD27⁺ (barras negras), CD28⁺CD27⁻ (barras grises oscuras), CD28⁻CD27⁻ (barras grises claras) o CD28⁻CD27⁺ (barras blancas) (C) para las células CD4⁺ y (D) para las células CD8⁺ obtenidas a partir de $n = 4$ donantes.

FIGURA 29. Los linfocitos humanos TK⁺ de memoria central son células no polarizadas. El día 14, las células TK⁺ generadas con aCD3 y cultivadas con IL-2 o generadas con baCD3/CD28 y cultivadas con IL-7 e IL-15 se analizaron respecto a la producción de citoquinas. Después de selección respecto a la expresión de ΔLNGFR, se analizaron las células por citometría de flujo respecto a la producción de IFN-γ e IL-4. Se consignan los valores medios de la distribución relativa (eje y, %) de IL-4⁺ y IFN-γ⁻ (barras blancas), IL-4⁺IFN-γ⁺ (barras grises), o IL-4⁻IFN-γ⁺ (barras negras) (A) para células CD4⁺ y (B) para células CD8⁺.

FIGURA 30. La activación con cuentas conjugadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y el cultivo con IL-7 ± IL-15 o IL-2 promueven la expansión de las células T y generan eficientemente linfocitos humanos modificados genéticamente con una ratio CD4/CD8 preservada. Se estimularon PBMC con cuentas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD28 (designadas "B") y se cultivaron sin citoquina alguna, o con IL-7 + IL-15, IL-2, o IL-7, o se estimularon con anti-CD3 soluble y se cultivaron con IL-2. 48 y 72 horas después de la estimulación inicial, las

células se sometieron a transducción por el vector retroviral SFCMM3. A) El día 6, las células genéticamente modificadas se cuantificaron por citometría de flujo después de tinción con anticuerpos anti-LNGFR. Se consignan los valores medios de la eficiencia de transducción (en %) en las diferentes condiciones de estimulación y cultivo. B) El día 10, se analizaron las células por citometría de flujo respecto a la expresión de Δ LNGFR y la expresión de CD4 y CD8. Se consignan los valores medios de la ratio CD4/CD8 en las células modificadas genéticamente generadas con los diferentes protocolos. C) Los días 6 y 9, se contaron las células por exclusión con Azul Tripán. Se consignan los valores medios de multiplicidad de expansión de las células T en las diferentes condiciones de estimulación y cultivo (n = 5 donantes). * = p < 0,05 ** = p < 0,01.

FIGURA 31. La activación con cuentas conjugadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y el cultivo con IL-7 $\pm$ IL-15 o IL-2 generan linfocitos humanos transducidos con fenotipo de memoria central. El día 10, los linfocitos transducidos generados, bien con cuentas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD28 y cultivados sin citoquina alguna, o con IL-7 + IL-15, IL-2, o IL-7, o estimulados con anti-CD3 soluble y cultivados con IL-2 se analizaron respecto a fenotipo de memoria. Las células se analizaron por citometría de flujo para la coexpresión de CD45RA y CD62L. Se consignan los valores medios de la distribución relativa (eje y, %) de CD45RA⁺CD62L⁺ (células naïf), CD45RA⁺CD62L⁺ (células de memoria central), CD45RA⁺CD62L⁻ (células efectoras de memoria) o CD45RA⁺CD62L⁻ (efectores diferenciados terminalmente) en las células CD3⁺ Δ LNGFR⁺ (n = 6 donantes). * = p < 0,05, ** = p < 0,01.

FIGURA 32. La cinética de expresión del receptor de IL -2/15 (CD122) no depende del procedimiento de activación, cultivo y transducción. Los días 0, 2, 4, 9 y 13, después de la estimulación inicial, los linfocitos transducidos generados con cuentas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD28 y cultivados en ausencia de citoquinas, o con IL-7 + IL-15, IL-2, o IL-7, o estimulados con anti-CD3 soluble y cultivados con IL-2 se analizaron respecto a la expresión de CD122. Se consigna el % de células CD3⁺ (los días 0, 2 y 4) y de células transducidas (los días 9 y 13) que expresaban CD122 en momentos diferentes en A) células CD8⁺ y B) células CD4⁺. (n = 4 donantes).

FIGURA 33. La activación con cuentas conjugadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y el cultivo con IL-7 $\pm$ IL-15 o IL-2 promueven la expresión intensa y prolongada del receptor α IL-2 (CD25) en los linfocitos transducidos. Los días 0, 2, 4, 9 y 13, después de la estimulación inicial, los linfocitos transducidos generados con cuentas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD28 y cultivados en ausencia de citoquinas, o con IL-7 + IL-15, IL-2, o IL-7, o estimulados con anti-CD3 soluble y cultivados con IL-2 se analizaron respecto a la expresión de CD25. El % de células CD3⁺ (los días 0, 2 y 4) y de células transducidas (los días 9 y 13) que expresaban CD25 en momentos diferentes se consignan en A) células CD8⁺ y B) células CD4⁺. (n = 4 donantes). * = p < 0,05, ** = p < 0,01.

FIGURA 34. La activación con cuentas conjugadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y el cultivo con IL-7 promueve la expresión intensa y prolongada del receptor α IL-7 (CD127) en los linfocitos transducidos. Los días 0, 2, 4, 9 y 13, después de la estimulación inicial, los linfocitos transducidos generados con cuentas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD28 y cultivados en ausencia de citoquinas, o con IL-7 + IL-15, IL-2, o IL-7, o estimulados con anti-CD3 soluble y cultivados con IL-2 se analizaron respecto a la expresión de CD127. Se consigna el % de células CD3⁺ (los días 0, 2 y 4) y de células transducidas (los días 9 y 13) que expresaban CD127 en momentos diferentes en A) células CD8⁺ y B) células CD4⁺. (n = 4 donantes). * = p < 0,05; ** = p < 0,01.

FIGURA 35. La activación con cuentas conjugadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y el cultivo con IL-7 preservan un alto potencial alorreactivo proliferativo y una baja sensibilidad a las señales apoptóticas en las células transducidas.

Las células T transducidas generadas con cuentas conjugadas con anti-CD3 y anti-CD28 y cultivadas con IL-7 o IL-2, o por activación con anti-CD3 soluble y cultivo en IL-2 se tiñeron con CFSE el día 9 después de la estimulación inicial, y se co-cultivaron con PBMCs alogénicos irradiados. Linfocitos de sangre periférica (PBL) no manipulados procedentes de los mismos donantes se tiñeron con CFSE, se co-cultivaron con los mismos PBMCs alogénicos irradiados y se utilizaron como controles. Después de 7 días se contaron las células, se tiñeron con To-pro3, y se analizaron por FACS para evaluar el porcentaje de células en división y/o células moribundas. A) porcentaje de células en división. B) número total de células moribundas. La muerte celular inducida por la activación se calculó sobre las células en división (parte blanca inferior de los histogramas) y la muerte por abandono se calculó sobre las células que no se dividían (parte negra superior de los histogramas). * = p < 0,05; ** = p < 0,01.

FIGURA 36. La capacidad de autorrenovación de las células genéticamente modificadas de memoria central generadas con cuentas conjugadas con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y cultivo con IL-7, después de estimulación alogénica.

A) Las células tratadas como se describe en la Figura 35 se analizaron en cuanto a la expresión de CCR7 e IL-7Ra, 7 días después del inicio de la MLR. El porcentaje de células CCR7⁺ (panel superior) e IL-7Ra⁺ (panel inferior) en división se representa en el cuadrante superior izquierdo. B) Las células se enfrentaron luego nuevamente in vitro a los mismos estimuladores alogénicos, siguiendo las mismas condiciones de cultivo utilizadas en la primera estimulación. Se muestra el porcentaje de células en división después de la estimulación secundaria.

FIGURA 37. Los linfocitos transducidos generados con anticuerpos CD3/CD28 en cuentas se injertan rápidamente en ratones NOD/Scid.

Ratones NOD/Scid se acondicionaron y trasplantaron con piel humana, se infundieron por vía intravenosa con 20×10^6 linfocitos transducidos generados con cuentas CD3/CD28 y cultivados con IL3 o IL2, o con OKT3 y cultivo con IL-2. La formación de quimeras humanas se evaluó semanalmente por citometría de flujo después de tinción para CD3 humano y CD45 de ratón. Se ajustaron los cuadrantes y los porcentajes de acuerdo con tinción de control isotipo. Se muestra la cinética de la formación de quimeras humanas (n = 4 donantes).

FIGURA 38. Los linfocitos transducidos generados con cuentas CD3/CD28 y cultivados con IL-7 inducen GvHD xenogénica en ratones NOD/Scid.

Ratones NOD/Scid se acondicionaron y trasplantaron con piel humana, se infundieron por vía intravenosa con 20×10^6 linfocitos transducidos generados con cuentas CD3/CD28 y cultivo con IL7 o IL2, o con OKT3 y cultivados con IL-2. Los ratones respecto a GvHD xenogénica de acuerdo con 1) pérdida de peso, 2) registro clínico de GvHD (descrito en materiales y métodos). Controles: animales que no recibieron infusiones de linfocitos.

FIGURA 39. Los linfocitos transducidos generados con cuentas CD3/CD28 y cultivados con IL-7 inducen GvHD alógena grave en los ratones NOD/Scid.

Tres semanas después de la infusión con células T humanas, los ratones quimera NOD/Scid se sacrificaron y se retiró bilateralmente la piel humana. Todas las biopsias fueron analizadas subsiguientemente a ciegas por patólogos mediante tinción con hematoxilina-eosina (EE) y con CD3 anti-humana (α hCD3). Se muestran secciones representativas.

Materiales y Métodos

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético del Instituto Científico San Raffaele y se realizaron de acuerdo con sus directrices.

Análisis por Citometría de Flujo

Donde se indica, las células se tiñeron superficialmente con mAb anti-CD4 o anti-CD8, y con mAbs anti-CD44, anti-CD127, anti-CD25, anti-CD132 y anti-CD62L (todos ellos de PharMingen excepto el Ab anti-CD127, clon A7R34, de Bioscience), y se fijaron, permeabilizaron y tiñeron ulteriormente con el mAb anti-Bcl-2 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Activación, Cultivo y Transducción Retroviral de las Células T Humanas

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por separación en gradiente de Lymphoprep de capas de superficie de plasma coagulado de donantes sanos obtenidas después de consentimiento informado (Fresenius, Oslo, Noruega). Se cultivaron los PBMC en medio RPM11640 (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) complementado con antibióticos, glutamina y con FBS al 10% desactivado por calor (Bio Whittaker-Italia, Milán, Italia). Se sembraron los PBMC en placas de 6 pocillos (1×10^6 /ml) y se activaron con anti-aCD3 (OKT3 30 ng/ml, OrthoBiotech, Raritan, NJ) o baCD3/CD28 paramagnéticos (3:1 cuentas/células T) (Dynabeads, Dynal Biotech, o XCyte, Therapies Inc., Seattle WA, EE.UU., Invitrogen). Las células T se enriquecieron por baCD3/CD28 antes del cultivo. Las células activadas con aCD3 se cultivaron con IL-2 humana recombinante a 600 UI/ml (Chiron, Emeryville, CA).

Las células activadas con baCD3/CD28 se cultivaron: 1. En ausencia de citoquinas; 2. Con IL-7 humana recombinante a la concentración mínima de 5 ng/ml (Peprtech, Londres, Reino Unido); 3. Con IL-7 e IL-15 humanas recombinantes, ambas a la concentración mínima de 5 ng/ml cada una (Peprtech, Londres, Reino Unido). Los días 2 y 3, se sometieron las células a transducción con el sobrenadante retroviral SFCMM3 por espinulación a 2400 rpm durante 2 horas a 37°C con polibreno 8 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO). El vector retroviral SFCMM3 codifica el gen suicida TK bajo el promotor LTR y una forma truncada del receptor de afinidad baja para el factor de crecimiento de los nervios (Δ LNGFR) bajo el promotor SV40 (27). El sobrenadante retroviral fue proporcionado por Molmed s.p.a. El día 6 después de la activación de las células T, las cuentas calibradas como células utilizadas para la estimulación se separaron de las células T, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos experimentos, el día 7 después de la activación de las células T, los linfocitos sometidos a transducción se seleccionaron positivamente de acuerdo con el protocolo que sigue (protocolo titulado: Inmunoselección positiva de linfocitos transducidos).

Las células se cultivaron hasta 14 días. El día 14, se calculó la multiplicidad de expansión multiplicando los porcentajes de células LNGFR⁺ determinados por citometría de flujo con los recuentos de Azul Tripán. Se reemplazaron el medio y las citoquinas, de acuerdo con el protocolo inicial, cada 3-4 días. En los momentos seleccionados, se calculó la multiplicidad de expansión multiplicando los porcentajes de células Δ LNGFR⁺ determinados por citometría de flujo por los recuentos de Azul Tripán.

Inmunoselección positiva de los linfocitos transducidos

El día 7 después de la activación de las células T, los linfocitos transducidos se seleccionaron positivamente. Dado que las células transducidas expresaban Δ LNGFr en su superficie, se utilizaron anticuerpos anti-LNGFr cubiertos con cuentas magnéticas para separar los linfocitos transducidos de los no transducidos.

- 5 Se recogieron las células de las placas en tubos, se lavaron (1500 rpm, 10 min a la temperatura ambiente-RT) y se suspendieron de nuevo en W78 a una concentración final de 5×10^6 /ml. Se añadió luego el anticuerpo anti-LNGFr 20.1 a la suspensión de células ($1 \text{ g}/20 \times 10^6$) y las células se dejaron en rotación a 10 rpm durante 30 min a RT. Se lavaron luego una sola vez las células T y se resuspendieron en WB a 25×10^6 /ml. Se añadieron después Dynabeads M-450 con IgG de oveja anti-ratón (5×10^6 cuentas/ 10^6 clones positivos) y las células se dejaron en rotación a 10 rpm durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Las células transducidas se seleccionaron luego magnéticamente. A este fin, se pusieron los tubos cerca del imán durante 3 min y se desechó la fracción negativa. Este procedimiento se repitió un total de 3 veces. Finalmente, la fracción de células unidas a las cuentas se separó del imán, se lavó, y se resuspendió en medio nuevo con el cóctel de citoquinas apropiado a una concentración de 1×10^6 células/ml.

15 Citometría de flujo de las células T transducidas

- Se utilizó citometría de flujo para análisis del fenotipo de superficie, la eficiencia de transducción, el ciclo celular y la producción de citoquinas. Se utilizaron los anticuerpos siguientes (Pharmingen): mAb conjugado a FITC para CD4, CD8, CD45RA, CD27 e IFN- γ humanos, mAb conjugado a PE para CD4, CD8, LNGFR, CD62L, CD28 e IL-4 humanos, mAb conjugado a la proteína peridinin-clorofila (PerCP) para CD45 de ratón (Ly5.1), y mAb conjugado a alofocianina (APC) para CD3 humano. Las muestras se ejecutaron a través de un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) después de control teñido con mAb irrelevante del mismo isotipo conjugado con fluorocromos y los datos se analizaron utilizando Software CellQuest (Becton Dickinson).

Se utilizaron también anticuerpos conjugados con fluorocromos para CD127, CD122, CCR7, y CD45 de ratón (Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.) para teñir los linfocitos.

25 Producción de citoquinas

- Para determinación de la producción de citoquinas, se sembraron células en placas de 24 pocillos (1×10^6 /ml) y se estimularon con 50 ng/ml de PMA (Estigma) y 1 μ g/ml de ionomicina (Sigma). Después de 4 h, se añadió brefeldina A (Sigma) durante 2 horas más (10 μ g/ml). Las células se tiñeron luego con los anticuerpos marcadores apropiados anti-superficie conjugados con fluorocromos y se fijaron con 1% de para-formaldehído a 4°C durante 10 min. La tinción intracelular se realizó con los anticuerpos anti-citoquina conjugados con fluorocromos apropiados después de incubación durante 20 min a RT en PBS con 2% de FBS que contenía 0,05% de saponina (Sigma).

Ensayo de dilución con CFSE y reacción de los linfocitos mixtos (MLR)

- El análisis de la alorreactividad de las células T se realizó el día 10 después de cultivo inicial de los linfocitos. Las células T transducidas se tiñeron con CFSE el día 10, y se cultivaron luego con PBMCs alogénicos irradiados. CFSE está constituido por una molécula de fluoresceína que contiene un grupo funcional éster de succinimido y dos restos acetato. CFSE se difunde libremente en las células y las esterasas intracelulares escinden los grupos acetato convirtiéndolo en un tinte fluorescente, incapaz de atravesar la membrana por permeación. El tinte no se transfiere a las células adyacentes. El CFSE es retenido por la célula en el citoplasma y no afecta desfavorablemente a la función celular. Durante cada tanda de división celular, la intensidad relativa del tinte se reduce a la mitad.

40 Procedimiento de tinción con CFSE:

- Las células se lavaron dos veces en PBS (en ausencia de suero) y se ajustaron a 2×10^7 /ml. Se diluyó CFSE a 1 μ M en PBS y se mezcló con la suspensión de células en una ratio 1:1. Las células se agitaron en seguida enérgicamente, se mezclaron durante 8 min a RT. Se añadió luego FBS en una ratio 1:1 y un minuto después se centrifugaron las células a 2000 rpm durante 2 min. Se desechó luego el sobrenadante, y se lavaron dos veces las células con una solución que contenía 10% de FBS (PBS o medio).

MLR

- Al final del procedimiento, las células T transducidas y teñidas con CFSE (sensibles) se dejaron en cultivo en placas de 24 pocillos con PBMCs alogénicos (estimuladores) irradiados con 2000 cGy en una ratio 1:1. No se añadió citoquina alguna al cultivo de células. Como control negativo se utilizaron células T transducidas teñidas con CFSE dejadas en cultivo en ausencia de estimuladores. Como control positivo se utilizaron células dejadas en cultivo con anticuerpo soluble anti-CD3.

Lecturas

En momentos seleccionados después de la estimulación, se recogieron muestras de las células y se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-marcadores de superficie conjugados con fluorocromos. Inmediatamente antes de la adquisición de FACS, se añadió 1 µl de solución To-Pro-3 a cada muestra de FACS. To-Pro-3 es un tinte de DNA de intercalación en el rojo lejano, detectable en fluorescencia 4, que ofrece la posibilidad de teñir conjuntamente las células con anticuerpos conjugados con FITC, PE y APC. Su función es revelar la fracción de células muertas.

Análisis in vivo

Ratones con defectos inmunológicos en el compartimiento adaptativo (Scid, genes activadores de la recombinación^{+/+}) así como en el compartimiento innato (NOD, cadena común^{+/+}) se utilizan comúnmente para estudiar la biología de los linfocitos humanos *in vivo*. Los inventores de la presente invención utilizaron ratones NOD/Scid para testar la actividad de los linfocitos de memoria central modificados genéticamente *in vivo*. Se obtuvieron ratones NOD/Scid hembra de 6 a 8 semanas de Charles-River Italia (Calco, Italia). El protocolo experimental fue aprobado por el comité interno para estudios con animales en el Instituto de los inventores (Institutional Animal Care and Use Committee [IACUC]). Los ratones se trataron de acuerdo con los protocolos siguientes:

Modelo de Enfermedad Xenogénica de Rechazo Inverso

Se obtuvieron ratones NOD/Scid hembra de 6 a 8 semanas de Charles-River Italia (Calco, Italia). Una semana antes de la infusión, los ratones se transfirieron desde aisladores de flujo laminar a jaulas normales y se mantuvieron en condiciones específicas exentas de patógenos, recibiendo agua estéril y pelets irradiados *ad libitum*. El día antes del experimento, se administró a los ratones 1 mg de anticuerpo monoclonal de bloqueo anti-ratón IL-2Rβ por vía intraperitoneal para neutralizar la actividad residual de NK. El anticuerpo anti-IL-2Rβ se produjo como se ha descrito a partir del hibridoma TMβ-1 proporcionado amablemente por el Prof. Tanaka (Osaka University, Japón). El día 0, los ratones recibieron irradiación total del cuerpo con una sola dosis de 350 cGy (irradiación gamma procedente de un acelerador lineal) y se infundieron inmediatamente con PBL sin modificar o linfocitos humanos transducidos con el vector retroviral SFCMM3 (28). Los PBL sin modificar se obtuvieron a partir de PBMC después del agotamiento de monocitos contaminantes, células B y células NK con el kit Pan de aislamiento de células T (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células se resuspendieron en 500 µl de medio X-VIVO15 y se infundieron por vía intraperitoneal. Los ratones se monitorizaron luego respecto a GvHD por cálculo de la pérdida de peso. Los ratones moribundos se sacrificaron por razones éticas. La fracción de quimeras humanas se determinó semanalmente por citometría de flujo después de sangrado de la vena del rabo. La formación de quimeras humanas se calculó como sigue: quimeras humanas (%) = $[\text{huCD3}^+ / (\text{huCD3}^+ + \text{mCD45}^+) \times 100]$.

Análisis de la GvHD Xenogénica

En la semana 1, 2 y 3 después de la infusión de las células T, los ratones se pesaron y se evaluaron respecto a GvHD xenogénica de acuerdo con el registro siguiente: pérdida de peso (0 para pérdida de peso < 10%, 1 para 10%-25%, 2 para > 25%), encorvamiento (0-2), actividad (0-2), textura del pelo (0-2), integridad de la piel (0-2), con índice máximo de 10. Se estimó también la pérdida de peso como variable independiente, dado que se consideró como el criterio más objetivo (Tabla 1).

Tabla 1: Evaluación de la xeno-GvHD clínica en ratones infundidos con células T humanas

Criterios	Grado 0	Grado 1	Grado 2
Pérdida de peso	< 10%	10-25%	>25%
Postura	Normal	Encorvamiento observado sólo en reposo	El encorvamiento acusado dificulta el movimiento
Actividad	Normal	Moderada a ligeramente reducida	Estacionario a no ser que se estimule
Textura del pelo	Normal	Moderada a ligeramente arrugada	Arrugado acusado / acicalamiento deficiente
Integridad de la piel	Normal	Exfoliación de las patas y el rabo	Áreas evidentes de piel desnuda

Modelo de GvHD alogénica

En el modelo de GvHD alogénica, los ratones se trasplantaron con piel humana y se infundieron con linfocitos alogénicos modificados genéticamente para valorar su aptitud para asentarse en la piel humana y mediar una región GvH alogénica. Una semana antes del trasplante, se transfirieron los ratones desde aisladores de flujo laminar a jaulas normales y se mantuvieron en condiciones específicas exentas de patógenos recibiendo agua estéril y pelets irradiados *ad libitum*. Alrededor de 3 semanas antes de la infusión de las células T humanas, los ratones se anestesiaron con 12-18 mg de avertina/ratón por vía intraperitoneal. Se depiló luego el lomo de los animales, y se realizó bilateralmente una incisión horizontal en la piel en el lomo de los animales. Se abrió luego una bolsa subcutánea, y se introdujo un pequeño fragmento de epidermis abdominal humana (privada de la grasa dérmica y el tejido conectivo). Al final del procedimiento, se suturó la herida. Dado que la temperatura de los ratones disminuye progresivamente durante la operación, los animales se colocaron en una cámara calentada durante aproximadamente 30 min y finalmente se transfirieron a sus jaulas.

Infusión de las células T humanas

Para facilitar el injerto de los linfocitos humanos en los ratones NOD/Scid, se desactivaron funcionalmente las células NK con anticuerpos del receptor de IL-2 antirratón (TM β -1) antes de la transferencia de los linfocitos. El anticuerpo se produjo a partir del hibridoma TM β -1 proporcionado amablemente por el Prof. Tanaka (Osaka University, Japón). El día 0, los ratones recibieron irradiación total del cuerpo con una dosis simple de 300 cGy (irradiación y procedente de un acelerador lineal). Los animales se pesaron luego y se infundieron inmediatamente con linfocitos humanos transducidos que se habían recogido el día 9 después de la estimulación inicial. Las células se infundieron por vía intravenosa en 250 μ l de solución salina.

Análisis del injerto de células T

En la semana 1, 2 y 3 después de la infusión de las células T, se recogieron aproximadamente 300 μ l de sangre/ratón de una pequeña incisión en la vena del rabo y se recogieron en tubos que contenían heparina. Los glóbulos rojos de la sangre se lisaron con una exposición de 3 min a ACK y se tiñeron luego para el análisis citofluorimétrico como se describe en el párrafo titulado "Tinción para Marcadores Superficiales y Análisis Citofluorimétrico".

Análisis de la GvHD alogénica

En la semana 3 después de la infusión de las células T, o antes en el caso de GvHD grave, se sacrificaron los ratones y se extrajeron bilateralmente los dos fragmentos de piel humana. La piel fijada con formalina e incrustada en parafina se cortó en secciones de 4 μ m de grosor y se tiñó con hematoxilina y eosina para evaluación morfológica. La valoración inmunohistoquímica respecto a la presencia de linfocitos T humanos se realizó con anticuerpo monoclonal anti-humano CD3 (Dako, Glostrup, Dinamarca) a dilución 1:100, por el método del complejo avidina/biotina-peroxidasa utilizando un equipo de inmunotinción Dako automático. La reacción de tinción se reveló por el método del cromógeno de tetrahidrocloreuro y las secciones se sometieron a contratinción con hematoxilina. Se obtuvieron imágenes con un instrumento Zeiss Axiocam HRC.

Análisis estadísticos

Para cada variable considerada en este estudio, se calcularon la mediana de los valores medios y la desviación estándar. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Redmond, WA) y su forma de adición Statce 12 (OMS Publish, Saitama, Japón). Se realizó el test F de Scheffe siguiendo el análisis de la varianza (ANOVA) para datos paramétricos, y se realizó el test U de Mann-Whitney siguiendo el test de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos.

Resultados y Discusión

Generación de células T humanas de memoria central modificadas genéticamente

Para la transducción retroviral de los linfocitos T se requiere proliferación de las células. Los inventores activaron PBMC con aCD2 o baCD3/CD28. Las células se activaron con baCD3/CD28 y se cultivaron con IL-7 e IL-15 o con aCD3 y se cultivaron con IL-2 (Figura 27A). Las células se transdujeron el día 2, por espinoculación, con el vector retroviral SFCMM3. La transducción se realizó al mismo tiempo y siguiendo el mismo protocolo. La activación con baCD3/CD28 en presencia de IL-7 e IL-15 promovía una expansión mayor de las células T (Figura 27A) y conducía a una mayor eficiencia de transducción que la activación con aCD3 en presencia de IL-2 (Figura 27B). Adicionalmente, al final del periodo de cultivo, se analizó la ratio fisiológica CD4/CD8 y se encontró que se mantenía mejor en las células transducidas activadas con baCD3/CD28 y cultivadas con IL-7 e IL-1 que con las células activadas con aCD3 y cultivadas con IL-2 (Figura 27C).

La activación policlonal requerida para la transducción retroviral de los linfocitos T enriquece en células de memoria

Para determinar la distribución relativa de los subconjuntos de memoria en las células T humanas transducidas con el vector retroviral, los inventores analizaron la coexpresión de CD45RA/CD62L. El día 14, las células T transducidas activadas con aCD3 y cultivadas con IL-2 eran principalmente CD45RA-CD62L⁻, es decir células de memoria efectoras. Por el contrario, las células T CD4⁺ transducidas activadas con baCD3/CD28 y cultivadas con IL-7 e IL-15 estaban fuertemente enriquecidas en CD45RA-CD62L⁺, es decir células de memoria central (Figura 28A). Se observó también un enriquecimiento de células CD45RA⁻ CD62L⁺ de memoria central en el caso de las células activadas por baCD3/CD28 y cultivadas con IL-7 e IL-15 para las células CD8 transducidas (Figura 28B). Para definir mejor el fenotipo de memoria, se analizó también la co-expresión de CD28/CD27. Mientras que para las células transducidas CD4⁺ no había diferencia alguna en la distribución relativa de los subconjuntos entre las dos condiciones (Figura 28C), para las células transducidas CD8⁺, la activación con baCD3/CD28 y el cultivo con IL-7 e IL-15 aventajaba a las células T CD28⁺ CD27⁺ (Figura 28D).

Correlatos funcionales de las células T humanas de memoria central modificadas genéticamente

Los linfocitos T humanos de memoria central y efectora, identificados por el fenotipo de superficie, difieren en la aptitud para producir citoquinas efectoras. El día 14, los inventores re-estimularon las dos poblaciones de células T modificadas genéticamente y analizaron las mismas respecto a la producción de citoquinas. Las células T CD4⁺ estimuladas con aCD3 y cultivadas con IL-2 producían eficientemente la citoquina efectora prototipo IFN- γ .

En contraste acusado, la mayoría de las células T CD4⁺ estimuladas con baCD3/CD28, IL-7 e IL-15 eran células no polarizadas y no producían IFN- γ ni IL-4 (Figura 29A). Se obtuvo un resultado similar con las células CD8⁺ (Figura 29B).

GvHD potencial de las células T humanas de memoria central modificadas genéticamente

Se han propuesto diferentes modelos de aloinjerto para estudiar la GvHD inducida por los linfocitos humanos.

Con objeto de evaluar la reactividad relativa anti-hospedador de los dos linfocitos T humanos suicidas centrales y efectores modificados genéticamente *in vivo*, se infundieron estas poblaciones en ratones NOD/Scid acondicionados con irradiación no letal y anticuerpos anti-NK. Se infundieron ratones de control con PBL singénicos humanos purificados. Los inventores observaron que los linfocitos de memoria central modificados genéticamente eran más eficientes respecto al injerto que su contrapartida de memoria efectora (formación de quimeras humanas en la semana 1: valor medio 0,45%, con intervalo 0,2-1,1 para células de memoria efectora modificadas genéticamente frente a valor medio 4,5% con intervalo 4,1-5,2 para las células de memoria central modificadas genéticamente, Tabla 2. Cinco de seis ratones infundidos con células T de memoria efectora modificadas genéticamente presentaban una formación de quimeras humanas reducida después de la semana 1 y no exhibían GvHD. Por el contrario, se observó una formación persistente de quimeras humanas en la mayoría de los ratones infundidos con células T suicidas de memoria central modificadas genéticamente, y cuatro ratones de seis desarrollaban GvHD grave.

Tabla 2. Injerto y enfermedad de rechazo inverso

	PBL	Células TK ⁺ de memoria efectora	Células TK ⁺ de memoria central
Quimerismo humano en % (intervalo) ^a	3,6 (2,5-5)	0,45 (0,2-1,1)	4,5 (4,1-5,2)
Incidencia de GvHD ^b	6/6	1/6	4/6
^a Valor medio (intervalo) en la semana 1 después de la infusión			
^b Definida como pérdida de peso > 10% del peso corporal inicial			

Generación de células T humanas de memoria central modificadas genéticamente

Para determinar los requerimientos mínimos a fin de obtener cierto número de células T humanas de memoria central modificadas genéticamente adecuadas para aplicación clínica, se compararon las cinco condiciones de transducción de células T siguientes:

1. Anticuerpos anti-CD3 solubles (OKT-3) + dosis altas de interleuquina 2 (600 UI/ml);
2. Cuentas anti-CD3/CD28 calibradas como células sin citoquina alguna;

3. Cuentas anti-CD3/CD28 calibradas como células + dosis bajas de IL-2 (200 UI/ml);
4. Cuentas anti-CD3/CD28 calibradas como células + dosis bajas de IL-7 (5 ng/ml);
5. Cuentas anti-CD3/CD28 calibradas como células + dosis bajas de IL-7 (5 ng/ml) + dosis bajas de IL-15 (5 ng/ml).

5 Las células se sometieron a transducción y se cultivaron siguiendo protocolos descritos en Materiales y Métodos. Estos experimentos dieron los resultados siguientes:

1. La activación con cuentas anti-CD3/CD28 permite una mayor eficiencia de transducción que la activación con anticuerpos solubles anti-CD3

10 Como se muestra en la Figura 30A, la eficiencia de transducción retroviral era significativamente mayor después de estimulación con cuentas magnéticas calibradas como células que después de estimulación con el anticuerpo soluble anti-CD3. Este resultado era independiente del uso de citoquinas en el cóctel de cultivo.

2. La activación con cuentas CD3/CD28 seguida por cultivo en presencia de citoquina (IL2, IL7 + IL15 o IL7) preserva la ratio fisiológica CD4/CD8 en los linfocitos T transducidos

15 Para evaluar la aptitud de los protocolos de transducción empleados por los inventores en la preservación de la ratio fisiológica CD4/CD8, se analizó la ratio CD4/CD8 de células transducidas producidas por protocolos diferentes, 10 días después de la estimulación inicial. Como se muestra en la Figura 30B, únicamente la estimulación con cuentas magnéticas seguida por cultivo en citoquinas (IL2, IL7 o IL7 + IL15) mantenía una ratio fisiológica CD4/CD8 en las células T transducidas, mientras que las ratios CD4/CD8 medias observadas con otras condiciones de cultivo no excedía de 1/1.

20 3. La activación con cuentas CD3/CD28 seguida por cultivo en presencia de citoquina (IL2, IL7 + IL15 o IL7) induce una tasa de proliferación notablemente mayor de células transducidas que otras condiciones de cultivo

25 El protocolo de la transferencia de genes ex vivo diseñado para aplicación clínica tiene que satisfacer los criterios relevantes relacionados con la factibilidad: uno de los mayores problemas de factibilidad en la traducción clínica de un método de terapia génica está relacionado con el número de células y la expansión de las células in vitro. Como se muestra en la Figura 30C, se observó una diferencia estadísticamente significativa en los números de células obtenidos entre células modificadas genéticamente estimuladas con cuentas y cultivadas con citoquinas, comparada con las otras condiciones (cuentas solas y OKT3 + IL-2). Estos resultados demuestran que los linfocitos transducidos obtenidos con cuentas conjugadas con anti-CD3/CD28 y cultivados con IL-7, IL-7 + IL-15 o IL-2 se expanden rápidamente in vitro hasta números adecuados para la aplicación clínica.

30 4. La activación con cuentas anti-CD3/CD28 genera principalmente linfocitos CD8⁺ y CD4⁺ transducidos de memoria central

35 Los inventores investigaron el inmunofenotipo de las células transducidas obtenidas en diferentes condiciones de cultivo por tinción FACS para CD3, CD4, CD8, CD45RA, y CD62L diez días después de la estimulación inicial. Se observó que una fracción muy alta (aproximadamente el 80%) tanto de células T CD8⁺ como CD4⁺, que habían sido estimuladas con cuentas anti-CD3/CD28, era CD45RA⁻ CD62L⁺: este patrón corresponde a linfocitos T de memoria central. Por el contrario, las células T estimuladas con OKT3 exhibían 60% de CD8⁺ y 45% de células T de memoria efectora CD4⁺ (CD45RA⁺ CD62L⁻) frente a 30% de linfocitos CD8⁺ y 50% de linfocitos CD4⁺ de memoria central TK⁺ (Fig. 31).

40 **Expresión del receptor de la cadena γ durante el cultivo de linfocitos transducidos**

45 Las expresiones de los receptores de citoquinas están fuertemente reguladas durante la estimulación de las células T. Los inventores analizaron la cinética de expresión de los receptores de citoquinas de la cadena γ durante los diferentes protocolos de cultivo y transducción de las células T, como medida de las funciones y el potencial de las células T. Para este propósito, se realizaron análisis citofluorimétricos después de tinción de las células transducidas con anticuerpos para CD122 marcados con fluorocromos (cadena β común de los receptores IL -2/15), CD25 (cadena α del receptor de IL-2) y CD127 (cadena α del receptor IL-7) en momentos diferentes después de la primera estimulación.

1. La expresión de la cadena del receptor IL -2/15 (CD122) no cambia entre los diferentes protocolos de transducción

50 Durante el curso de las respuestas inmunes, la expresión del receptor β IL-2/IL-15 aumenta después de la activación de las células T y disminuye luego hasta un nivel de expresión intermedio que se mantiene a lo largo de toda la fase de células de memoria (13).

La Figura 32 muestra la cinética de expresión de CD122 en los linfocitos transducidos durante 13 días de cultivo. No se observó diferencia alguna en términos de la expresión de CD122 en las células T cultivadas entre los cinco protocolos. En todos los casos, las células T, y en particular las células CD4⁺, regulaban en sentido creciente CD122 después de la activación, alcanzando un pico alrededor del día 4, cuando prácticamente el 100% de las células modificadas genéticamente expresaban la molécula. Las células regulaban luego lentamente en sentido decreciente la expresión de CD122, alcanzando el mismo nivel de expresión observado antes de la estimulación 13 días después del comienzo del cultivo de las células T, cuando las células habían alcanzado el estado de reposo.

2. La estimulación con cuentas CD3/CD28 promueve una expresión intensa y prolongada del receptor α de IL-2 en las células T transducidas

El receptor α de IL-2 (CD25) es un marcador de activación relevante para los linfocitos T. En condiciones fisiológicas, las células T naíf no expresan CD25; sin embargo, su expresión se regula rápidamente en sentido creciente por activación de las células T y usualmente disminuye antes de alcanzarse el pico proliferativo de la respuesta.

En las células transducidas activadas por cuentas, independientemente de las condiciones de cultivo subsiguientes, el análisis por citometría de flujo demostró que el día 2 después de la estimulación la mayoría de las células T experimentaban un aumento importante en la expresión del receptor α de IL-2. Por el contrario, únicamente 40% de las células transducidas activadas con OKT3 soluble regulaban en sentido creciente el receptor (Figura 33), lo que sugería que la mayoría de las células T no se activaban adecuadamente con este procedimiento de estimulación. Mientras se expresa CD25, las células T pueden proliferar a IL-2, participando así activamente en la respuesta inmune. En las células transducidas producidas después de la activación con cuentas, la expresión de CD25 se mantenía alta en la mayoría de las células hasta el día 13. Por el contrario, las células que regulaban CD25 en sentido creciente después de estimulación con el anticuerpo soluble anti-CD3 alcanzaron un pico de expresión dos días después que las células activadas con cuentas, y regulaban luego rápidamente la molécula CD25 en sentido decreciente.

3. Las células transducidas activadas con cuentas anti-CD3/CD28 + IL-7 exhiben la expresión máxima del receptor α de IL-7, un marcador de las células T de memoria de supervivencia larga

En condiciones fisiológicas, el receptor α de IL-7 (CD127) es expresado constitutivamente por las células T naíf. Su expresión está regulada en sentido decreciente por activación de las células T (de manera especular comparado con CD25) y dicha regulación decreciente podría promover la muerte celular. Inversamente, la expresión de CD127 aumenta a medida que progresa la respuesta inmune, alcanzando niveles elevados en las células T de memoria. IL-7 es un factor potente de supervivencia para los linfocitos T de memoria: el disparo del receptor por IL-7 promueve la supervivencia y proliferación de las células T y protege las células contra la apoptosis por diferentes caminos de señalización intracelular. Los inventores analizaron la cinética de la expresión de CD127 en las células transducidas utilizadas por ellos. El receptor α de IL-7 experimentaba una fuerte regulación decreciente después de estimulación (aproximadamente entre el día 1 y el día 6). A partir del día 7, la expresión aumentaba progresivamente y, curiosamente, se observaba una diferencia significativa en la proporción de células CD127⁺ transducidas obtenidas con las cuentas CD3/CD28 e IL-7 comparada con todas las restantes condiciones (Figura 34). A partir del día 9, más del 80% tanto de las células CD8⁺ como de las CD4⁺ TK⁺ se habían estimulado con cuentas calibradas como células e IL-7, eran positivas para el receptor α de IL-7. Esto sugiere que IL-7 es responsable del mantenimiento de niveles altos de expresión de CD127 en la mayoría de las células T después de activación, proporcionando así una ventaja exclusiva de supervivencia de larga duración a las células transducidas.

Los linfocitos transducidos generados con cuentas + IL-7 tienen el potencial alorreactivo máximo

De los resultados mostrados anteriormente, se deduce que la activación con cuentas magnéticas anti-CD3/CD28 y el efecto adyuvante de las citoquinas (en particular IL-7) son factores importantes para la generación de linfocitos T transducidos de memoria central, con un alto potencial de supervivencia.

El objetivo siguiente de los inventores fue investigar si estos linfocitos T transducidos con CM eran capaces realmente de suscitar una respuesta inmune potente y eficaz. Los inventores abordaron esta cuestión in vitro por estimulación de células transducidas con antígenos alogénicos, y obtuvieron los resultados siguientes:

1. Los linfocitos transducidos generados con cuentas + IL-7 tienen el potencial proliferativo máximo cuando se estimulan con un antígeno alogénico

Células T transducidas generadas en cada una de las cinco condiciones se tiñeron con CFSE y se co-cultivaron con PBMCs alogénicos irradiados. Después de una semana, se contaron los números de células y se analizó la dilución CFSE por FACS para evaluar el porcentaje de células en división. Como se muestra en la Figura 35A, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las condiciones que contenían IL-7 y los otros protocolos, en las células T CD3⁺ y CD8⁺: de hecho, un alto porcentaje (40%) de las células transducidas generadas con cuentas CD3/CD28 + IL-7 se habían dividido en una semana después de la estimulación alogénica. Por el contrario,

únicamente 20% de las células transducidas generadas con OKT3⁺ se habían dividido en las mismas condiciones de cultivo.

2. Los linfocitos transducidos generados con cuentas + IL-7 tienen la susceptibilidad mínima de muerte.

Con objeto de mantener la homeostasis de los linfocitos T, activación masiva de las células T en respuesta a un enfrentamiento alogénico va seguida usualmente por un programa apoptótico extenso, siendo IL-2 el factor principal en la denominada "muerte celular inducida por activación" (AICD). Para contrarrestar la AICD se requieren mecanismos para el desarrollo de una memoria inmunológica eficiente y de larga duración después de las respuestas inmunes primarias. Para investigar la sensibilidad de las células transducidas a la AICD, se tiñeron linfocitos CFSE⁺ alo-estimulados con To-Pro 3, un tinte fluorescente, que se fija selectivamente a las células muertas. Se calculó el número de células muertas en las poblaciones de células transducidas en división y no en división, a fin de evaluar respectivamente la muerte celular inducida por activación y la muerte por abandono (Figura 35B). Las células transducidas cultivadas en IL-2 (con independencia de la señal de activación) demostraban alta sensibilidad a la AICD y la muerte por abandono. Por el contrario, las células transducidas generadas con cuentas CD3/CD28 + IL-7 exhibían la mortalidad mínima, comparable a la de los linfocitos no modificados. Esta observación puede relacionarse con la expresión persistente de CD127 en una proporción elevada (33% de CD8⁺ y 52% de CD4⁺) de los linfocitos genéticamente modificados generados con cuentas CD3/CD28 e IL-7. De acuerdo con esta observación, los linfocitos transducidos generados con cuentas CD3/CD28 e IL-2, que demostraban alta sensibilidad a la muerte celular, exhibían la proporción mínima de células que expresaran CD127⁺ (30%). Las gráficas FACS en la Figura 36A muestran un ejemplo representativo de detección de CD127 en linfocitos T transducidos y teñidos con CFSE 10 días después de la estimulación alogénica.

3. Los linfocitos transducidos generados con cuentas + IL-7 preservan un fenotipo de memoria central después de estimulación alogénica

La memoria inmunológica está asegurada por una capacidad de autorrenovación de las células de memoria que, después de volver a encontrarse con un antígeno, se dividen, y generan a la vez efectores, capaces de eliminar directamente el patógeno, y células de memoria, capaces de proteger al hospedador a largo plazo. Para verificar si los linfocitos modificados genéticamente de memoria central tenían esta capacidad de autorrenovación, se analizó la expresión de CCR7 (un marcador de células de memoria central) en células teñidas con CFSE, el día 10 después de estimulación alogénica. Como se muestra en la Figura 36A, los datos de los inventores muestran que el 59% de los linfocitos CD3⁺ modificados genéticamente generados con cuentas CD3/CD28 e IL-7, que había experimentado al menos una división, eran positivos para la expresión de CCR7. Por el contrario, sólo 17% de los linfocitos CD3⁺ modificados genéticamente generados con OKT3 expresaban CCR7. El cultivo en presencia de IL-7 era esencial para preservar la capacidad de autorrenovación de los linfocitos de memoria central, dado que sólo el 36% de los linfocitos CD3⁺ modificados genéticamente generados con cuentas CD3/CD28 e IL-2 mantienen la expresión de CCR7 después de estimulación alogénica. De acuerdo con este resultado, cuando las células se reenfrentaron *in vitro* con los mismos estimuladores alogénicos, siguiendo las mismas condiciones de cultivo utilizadas en la primera estimulación, más del 70% de las células transducidas generadas con cuentas CD3/CD28 e IL-7 y únicamente el 50% de las células transducidas generadas con OKT3 proliferaban en la semana siguiente (Figura 36B).

Los linfocitos transducidos generados con cuentas + IL-7 tienen el máximo potencial alorreactivo *in vivo*

Para evaluar la eficacia de las células T transducidas de memoria central *in vivo*, se estableció un modelo químico nuevo, basado en ratones NOD/Scid trasplantados con piel humana. Basándose en los resultados obtenidos *in vitro*, los inventores decidieron investigar la potencia de los linfocitos de memoria central modificados genéticamente generados con cuentas CD3/CD28 + IL-7, cuentas CD3/CD28 + IL-2 y comparar la actividad funcional de estas células con linfocitos de memoria efectora modificados genéticamente, generados con OKT-3 e IL-2, y utilizados corrientemente en pruebas clínicas. Después de infusión de las células transducidas, se determinó la reactividad xenogénica de las células T por observación clínica, mientras que se evaluó la GvHD alogénica histológicamente y se correlacionó con el análisis de la infiltración de piel humana por las células transducidas. Los resultados de estos estudios se resumen a continuación:

Las células modificadas genéticamente generadas con CD3/CD28 e IL-7 se injertan rápidamente en los ratones NOD/Scid sometidos a trasplante de piel

El número de linfocitos T humanos en la sangre periférica de los ratones aumentaba desde la semana 1 a la semana 2 después de la infusión. Las células transducidas generadas con cuentas se injertaban en mayor proporción que las células transducidas generadas con OKT-3. La diferencia era más evidente en la segunda semana después de la infusión de las células T (Fig. 37).

La activación con cuentas CD3/CD28 y la estimulación con IL-7 confieren a las células transducidas la reactividad máxima contra los antígenos xenogénicos. Se monitorizó la GvHD xenogénica de acuerdo con un registro clínico descrito en Materiales y Métodos y por medida de la pérdida de peso.

Los ratones NOD/Scid infundidos perdían progresivamente su peso y algunos de ellos morían finalmente por GvHD xenogénica o se sacrificaron por razones éticas. Las células T más xeno-reactivas eran las estimuladas con cuentas anti-CD3/CD28 y cultivadas con IL-7, seguido por las células transducidas generadas con cuentas CD3/CD28 e IL-2. La estimulación con anticuerpos solubles anti-CD3 no generaba células T fuertemente xeno-reactivas, dado que los ratones infundidos con estos linfocitos no sufrían una pérdida de peso corporal significativa ni la aparición de otros signos clínicos de xeno-GvHD (Fig. 38).

La activación con cuentas CD3/CD28 y estimulación con IL-7 confieren a las células transducidas la reactividad máxima contra los antígenos alogénicos

El modelo de ratón quimera de piel humana NOD/Scid de la invención consiste en ratones NOD/Scid que se habían sometido a trasplante de piel, por la inserción de dos fragmentos de epidermis abdominal humana en dos bolsas subcutáneas en el lomo del ratón y que se habían infundido subsiguientemente por vía intravenosa con células modificadas genéticamente. El trasplante de piel humana permite investigar la reactividad de las células T contra los antígenos alogénicos, por estudios histológicos. La piel humana trasplantada, de hecho, contiene no sólo células epidérmicas y estromáticas, sino también algunas células presentadoras de antígeno, que son capaces de atraer los linfocitos circulantes y posiblemente promover su activación. Tres semanas después de la infusión de células T humanas, los ratones quimera NOD/Scid se sacrificaron y se extirpó bilateralmente la piel humana. Todas las biopsias fueron analizadas subsiguientemente a ciegas por patólogos mediante tinción con hematoxilina-eosina (EE) y CD3 anti-humano. Se observó una infiltración masiva de células T humanas en el contexto de la piel humana, únicamente en los ratones que habían sido infundidos con linfocitos T estimulados por "cuentas + IL-7". En las condiciones "OKT-3" el nivel de infiltración del tejido de células T, si acaso, era claramente escaso. La Figura 39 muestra ejemplos representativos de estos resultados.

Conclusión

Aunque está reconocido generalmente que las células T juegan un papel fundamental en la generación de inmunidad a los patógenos, a los tumores, y a inmuno-deficiencias así como en trastornos autoinmunes, ha sido difícil utilizarlas como marcadores de diagnóstico y pronóstico de inmunocompetencia en humanos. Adicionalmente, no existen en la actualidad técnicas adecuadas para la expansión de linfocitos no polarizados polifuncionales intermedios y de memoria central.

Los resultados descritos en este informe identifican nuevas condiciones de cultivo que:

A) permiten la acumulación independiente de Ag de células T de memoria cebadas *in vivo*;

B) guían la expansión de los linfocitos de memoria central a pesar de la estimulación policlonal de linfocitos y la manipulación genética.

Los resultados indican que pueden utilizarse IL-7 e IL-15 para enriquecer muestras biológicas, tales como LN periféricos, sangre, y tumores respecto a células CD4⁺ o CD8⁺ con especificidad de Ag imprimado *in vivo* (tumores/patógenos/alérgenos/auto-antígenos). Cuando se comparó con IL-2, IL-7 mantenía mejor el fenotipo y la representación originales de los linfocitos y favorecía mejor la supervivencia de todos los conjuntos de linfocitos T, permitiendo la detección y expansión de linfocitos de memoria T CD4⁺ raros.

La posibilidad de enumerar las células T CD4⁺ o CD8⁺ con especificidad de Ag en el contexto de una infección viral crónica, enfermedad autoinmune, vacunación o inmunoterapia podría proporcionar una medida directa de la inmunocompetencia o enfermedad de los pacientes y ayudar a los clínicos en la elección de la terapia más apropiada. Adicionalmente, la posibilidad de enriquecer células T de memoria cebadas *in vivo* sin alterar su fenotipo podría mejorar su caracterización, así como su aprovechamiento para la respuesta inmune en estrategias de inmunoterapia adoptiva. Finalmente, pueden obtenerse células T de memoria central modificadas genéticamente por activación de CD3/CD28 y cultivo con citoquinas homeostáticas. Cuando se funden en hospedadores condicionados inmunodeficientes, las células T de memoria central modificadas genéticamente i) se injertan y expanden a niveles significativamente mayores que las células T efectoras modificadas genéticamente de memoria y ii) son más potentes que los linfocitos efectores de memoria modificados genéticamente para inducir una respuesta inmune a los antígenos del hospedador y antígenos alogénicos.

Estos resultados demuestran que pueden obtenerse linfocitos modificados genéticamente de memoria central totalmente funcionales y aprovecharse para la curación de enfermedades humanas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método *in vitro* para obtener una población de células T de memoria modificadas genéticamente, que se caracteriza por comprender los pasos de:
 - a) activar linfocitos con al menos dos anticuerpos agonistas de receptores de activación específicos en donde uno de los anticuerpos agonistas de receptores de activación de linfocitos es específico para el polipéptido CD3 y el otro anticuerpo agonista de los receptores de activación de linfocitos es específico para el anticuerpo CD28;
 - b) exponer los linfocitos activados a una cantidad eficaz de al menos IL-7 e IL-15, capaz de expandir selectivamente poblaciones de células T de memoria;
 - c) insertar y expresar un gen exógeno por medio de un vector apropiado en las células obtenidas en b).
- 2.- El método *in vitro* de la reivindicación 1 en donde dichas poblaciones de células T de memoria comprenden poblaciones de células T CD4⁺ y/o CD8⁺ y/o y8 y/o NKT.
- 3.- El método *in vitro* de las reivindicaciones 1 ó 2 que se caracteriza porque en el mismo dichos linfocitos se derivan de una muestra biológica perteneciente al grupo de: muestras de sangre y otros líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólido, cultivos tisulares de células derivadas de los mismos y la progenie de los mismos, células aisladas de muestras biológicas.
- 4.- El método *in vitro* de las reivindicaciones 1 a 3 que se caracteriza porque en el mismo el agonista receptor de activación de los linfocitos específico está conjugado con soportes que mimetizan células.
- 5.- El método *in vitro* de las reivindicaciones 1 a 4 que se caracteriza porque en el mismo los soportes que mimetizan células son cuentas paramagnéticas.
- 6.- El método *in vitro* de las reivindicaciones 1 a 5 que se caracteriza porque en el mismo el vector es un vector viral.
- 7.- El método *in vitro* de las reivindicaciones 1 a 6 que se caracteriza porque en el mismo el gen exógeno codifica un gen suicida, y/o un gen marcador, y/o una molécula biológicamente activa, y/o un receptor, y/o un factor soluble retenido en la célula o liberado al exterior de la célula y/o un gen que confiere resistencia a un profármaco.

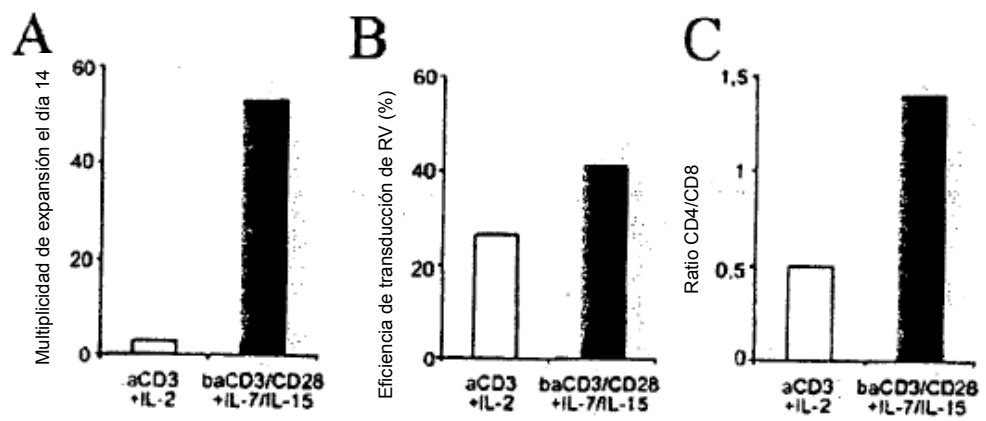


Fig. 27

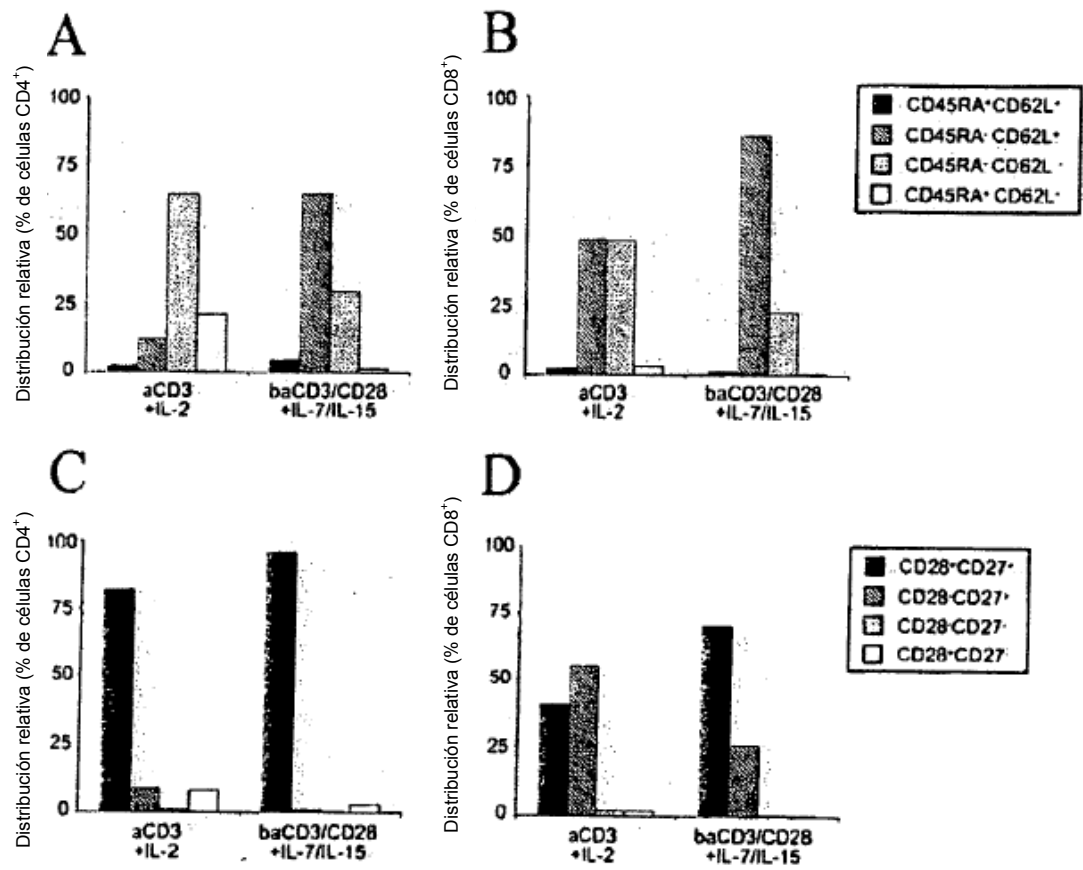


Fig. 28

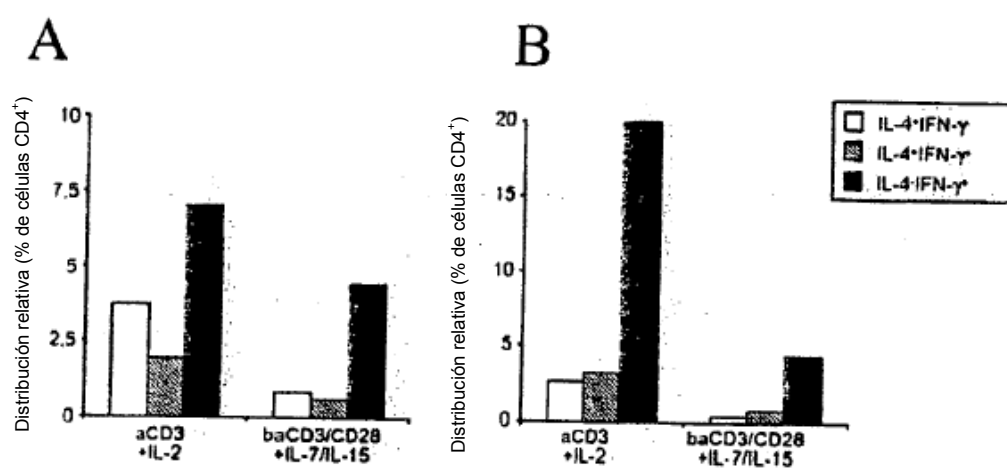


Fig. 29

C

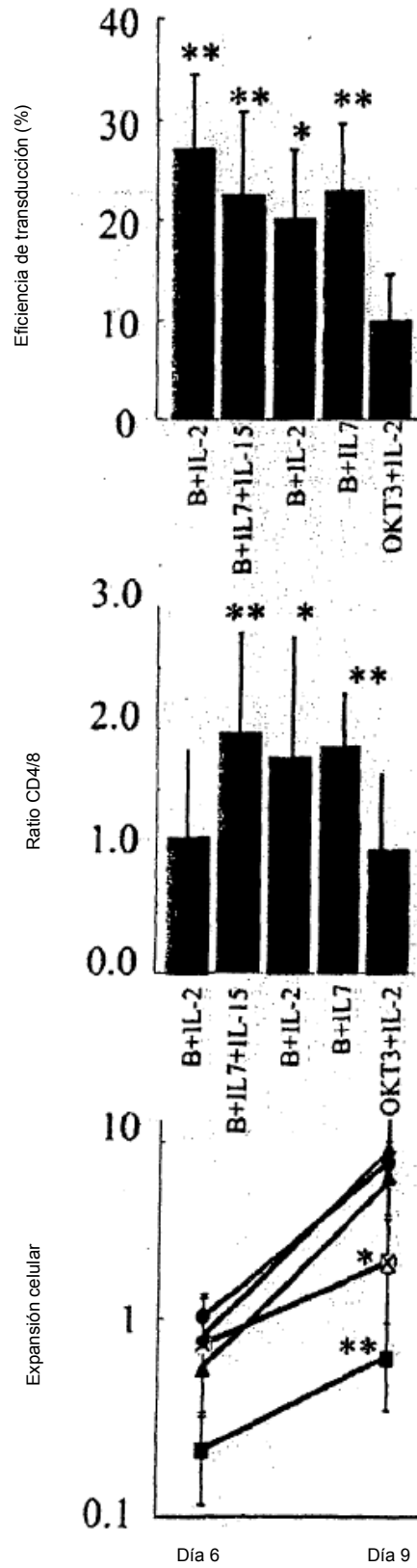


Fig. 30

- * B
- ◆ B+IL-7+IL-15
- ★ B+IL2
- ◆ B+IL7
- OKT3 + IL-2

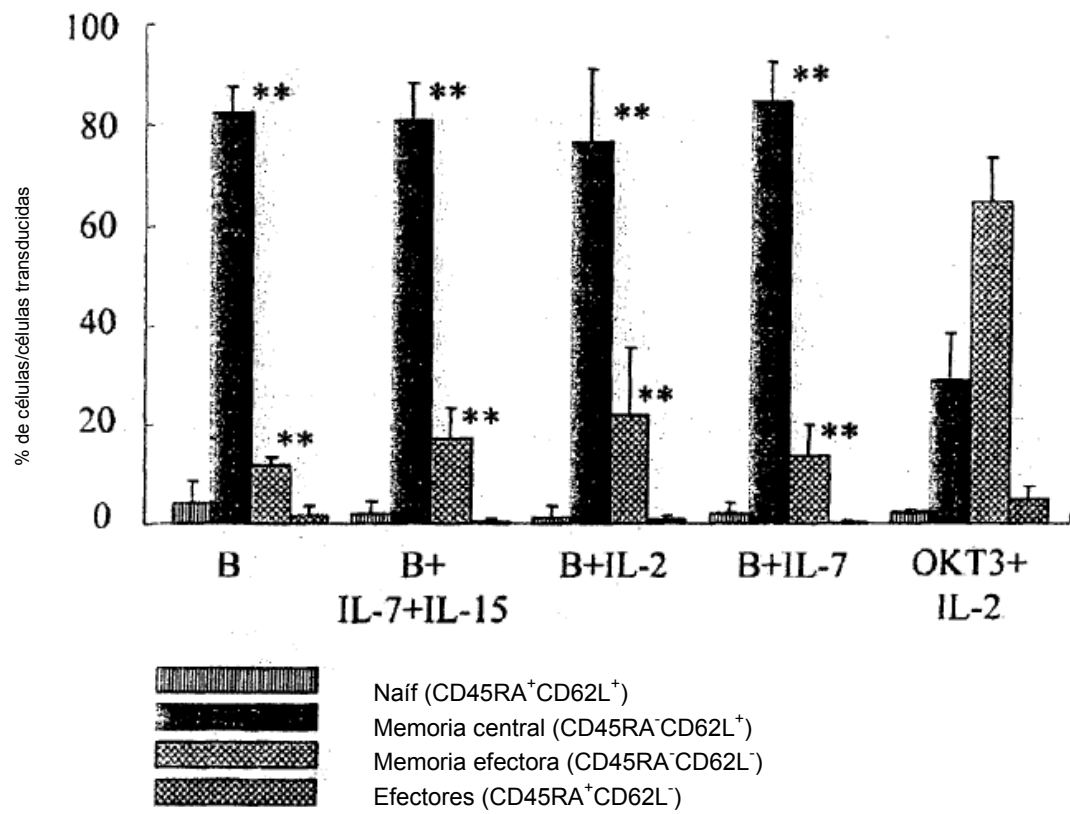
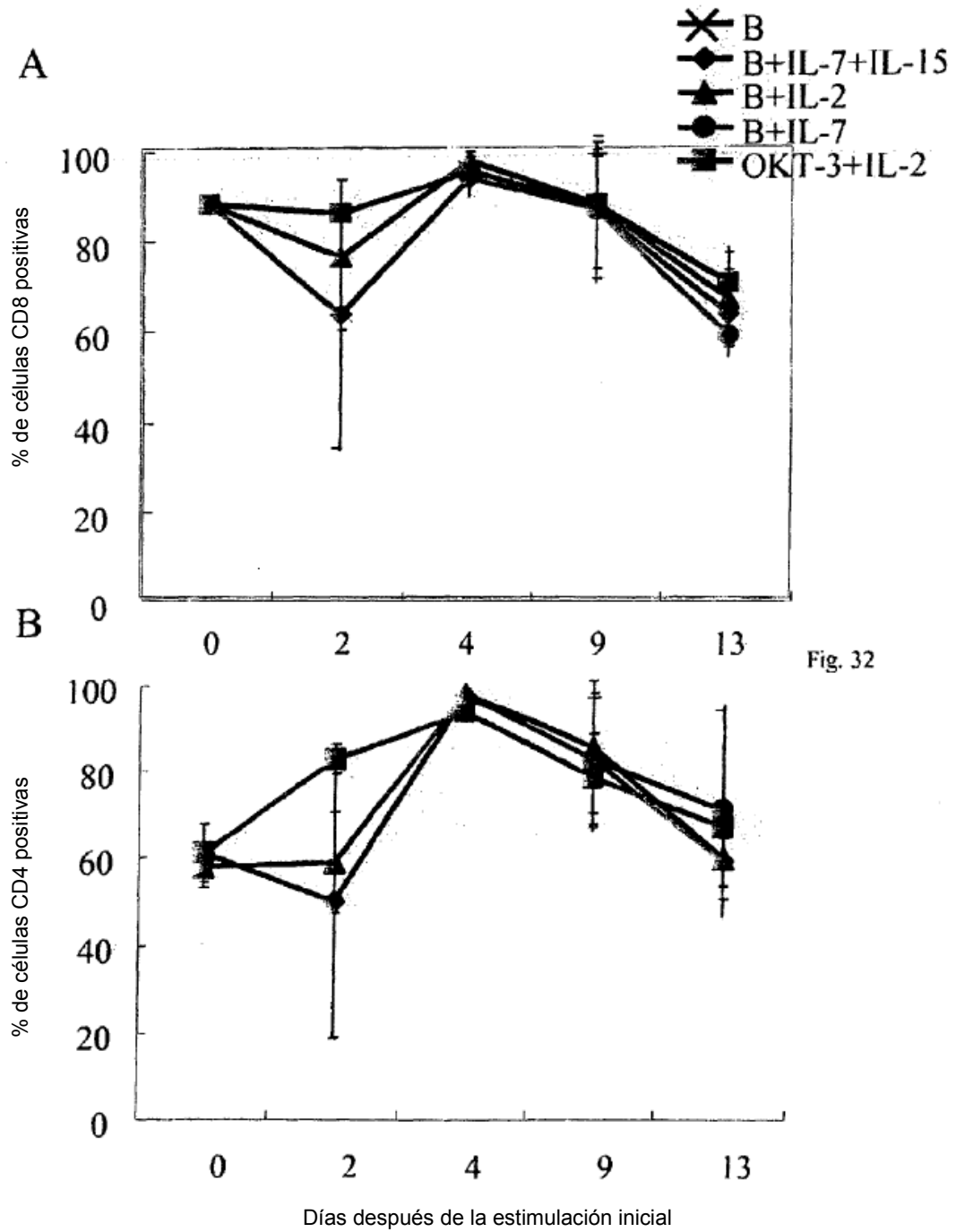
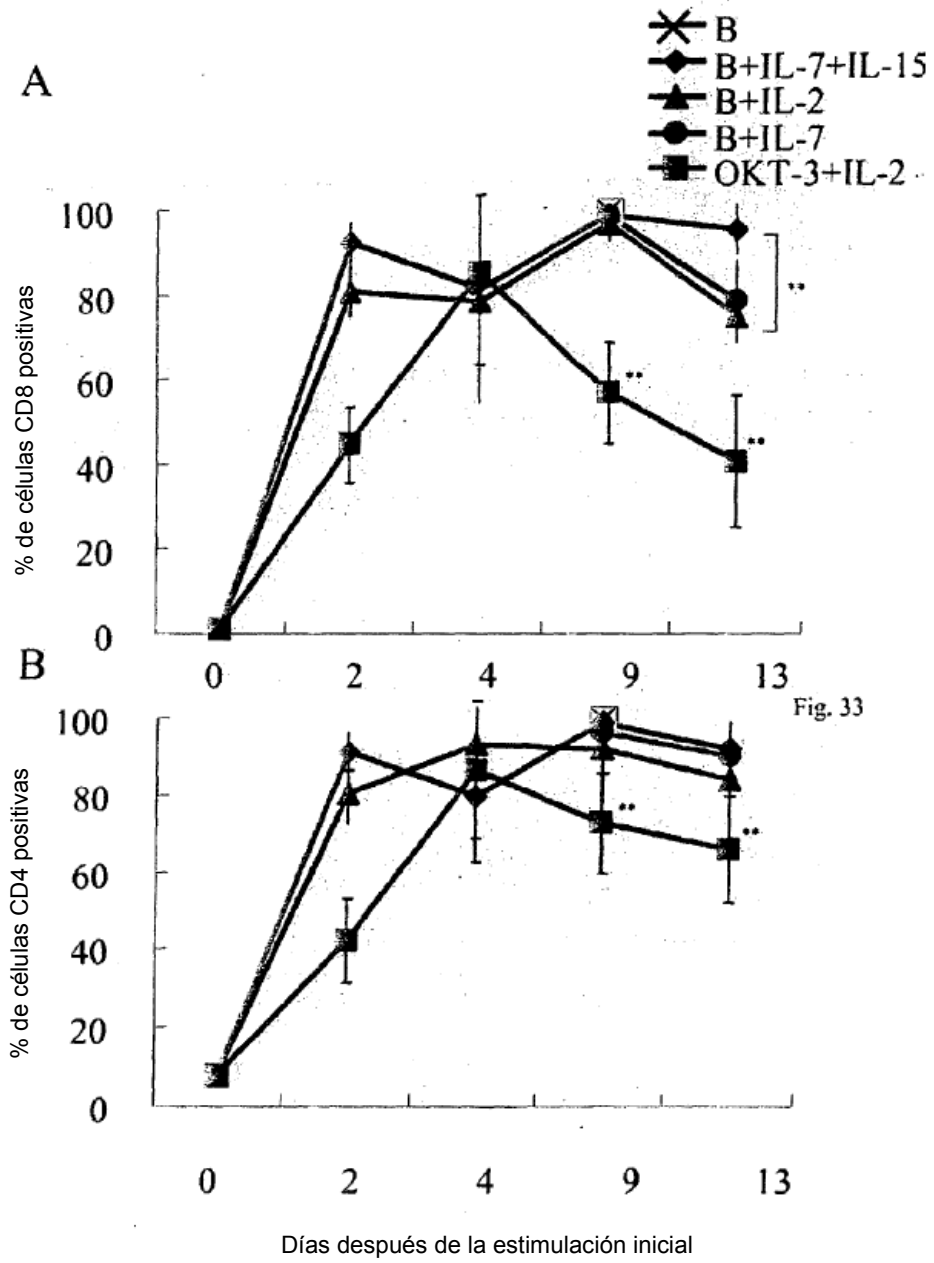
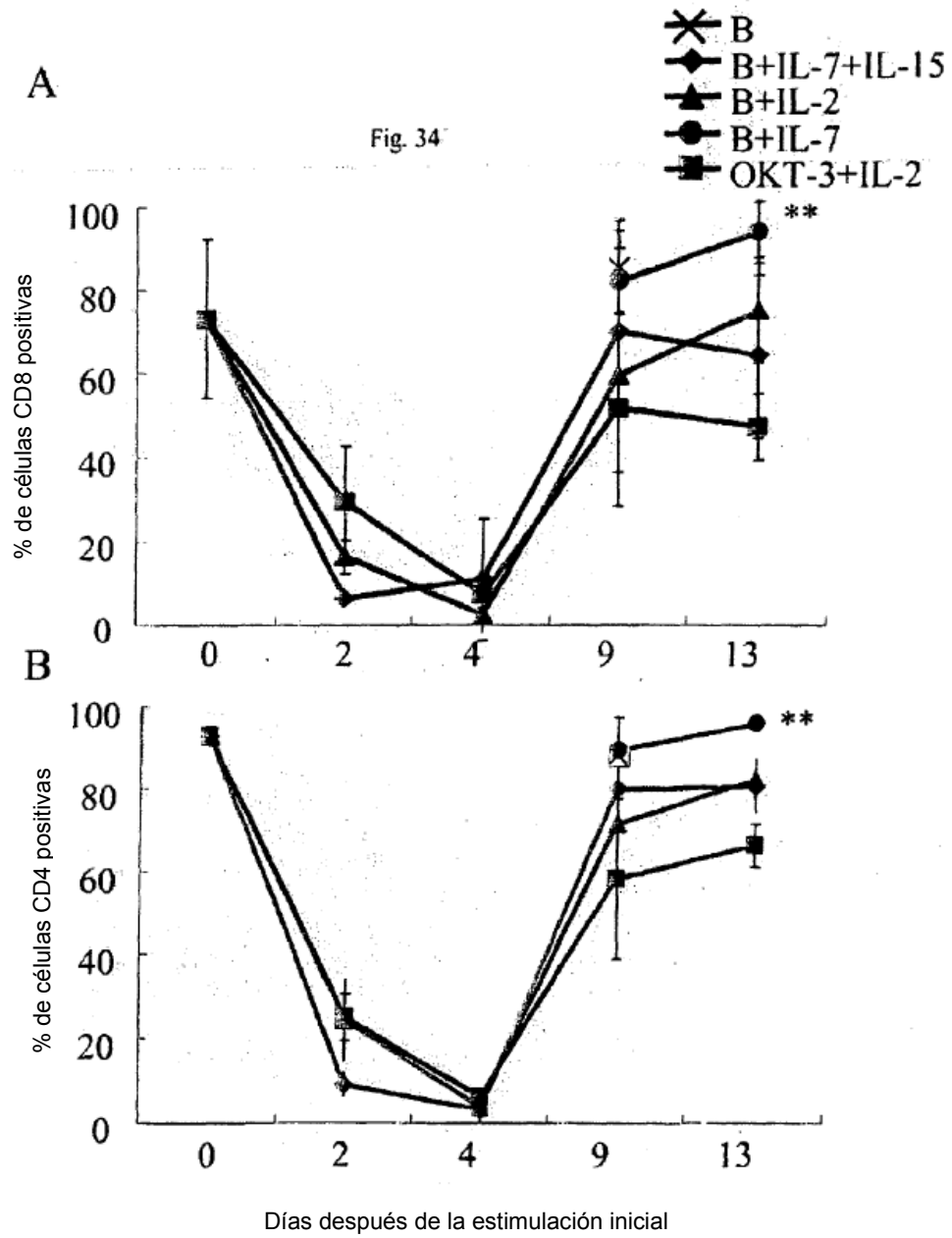


Fig. 31







A

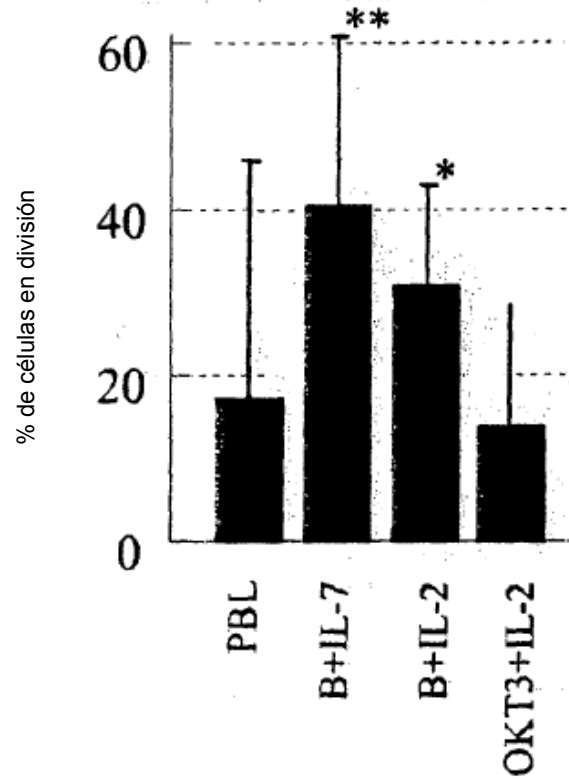
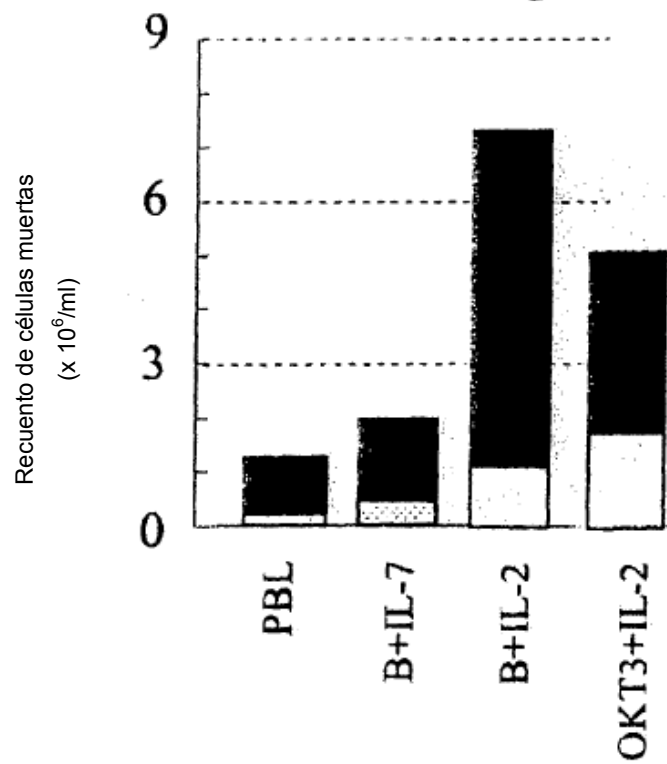


Fig. 35

B



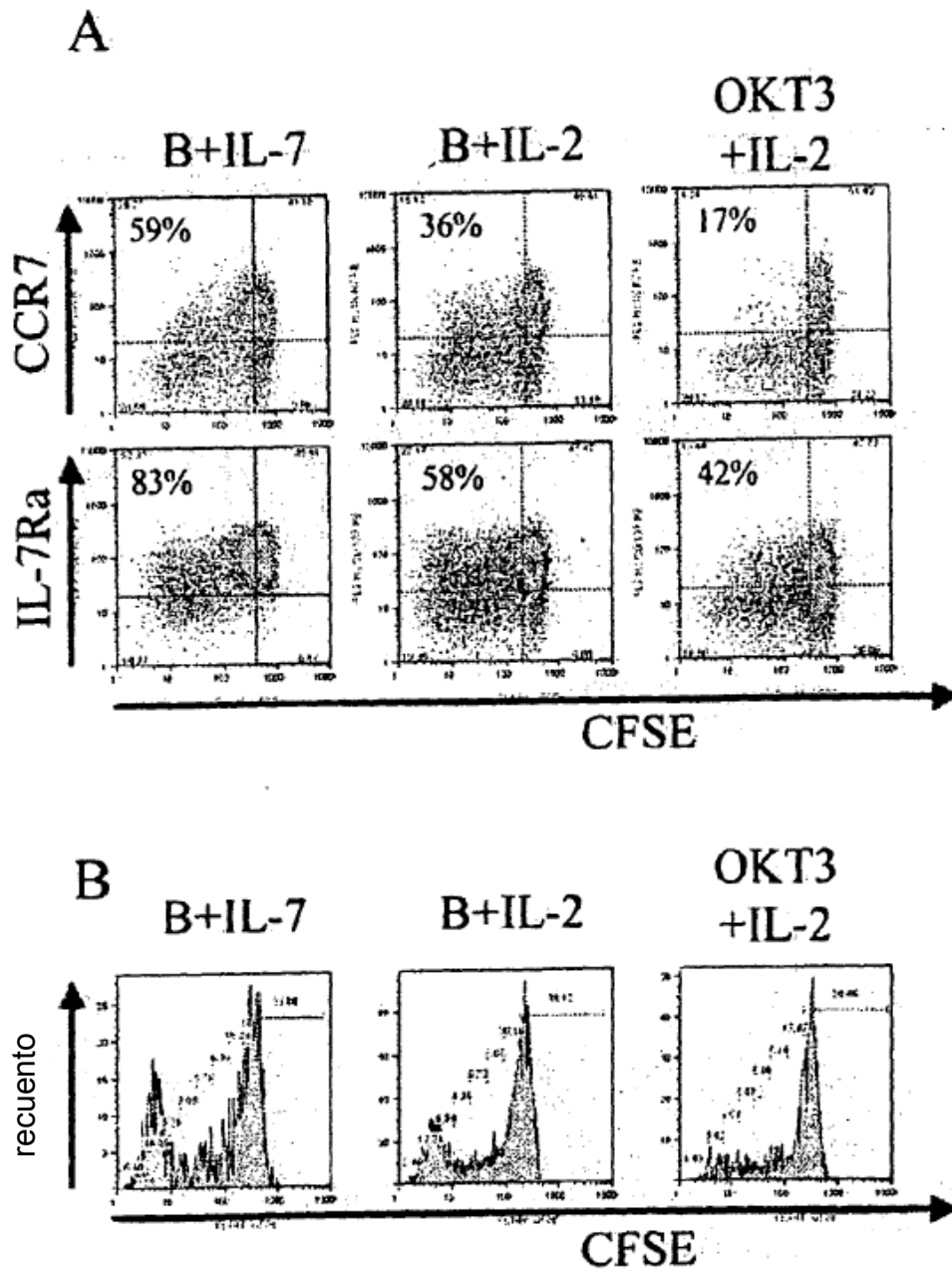
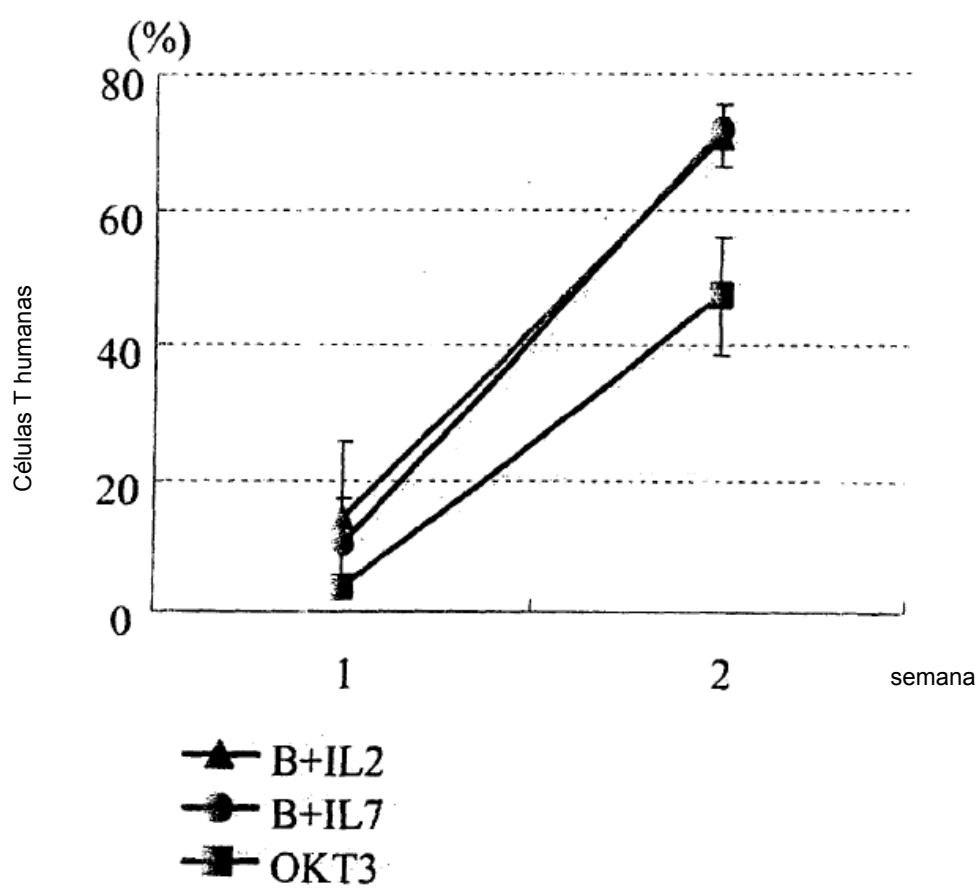


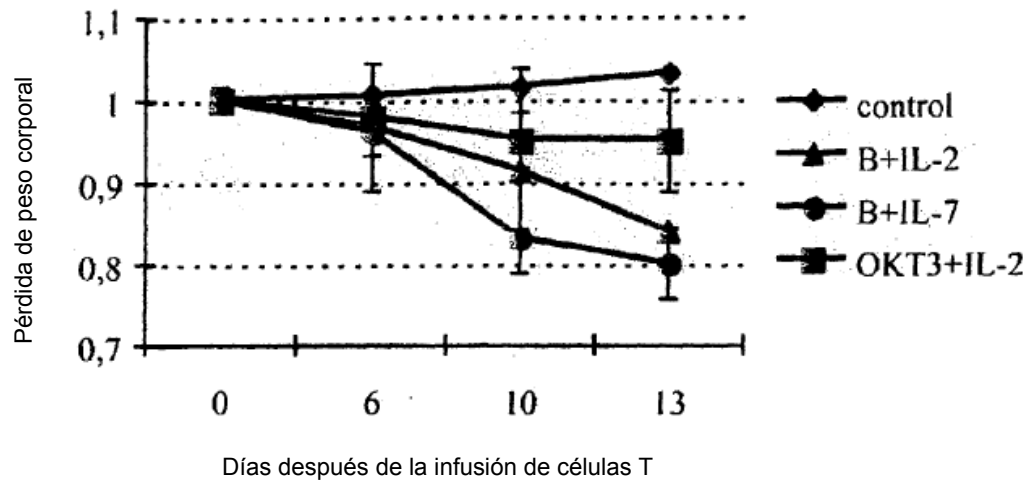
Fig. 36

Fig. 37

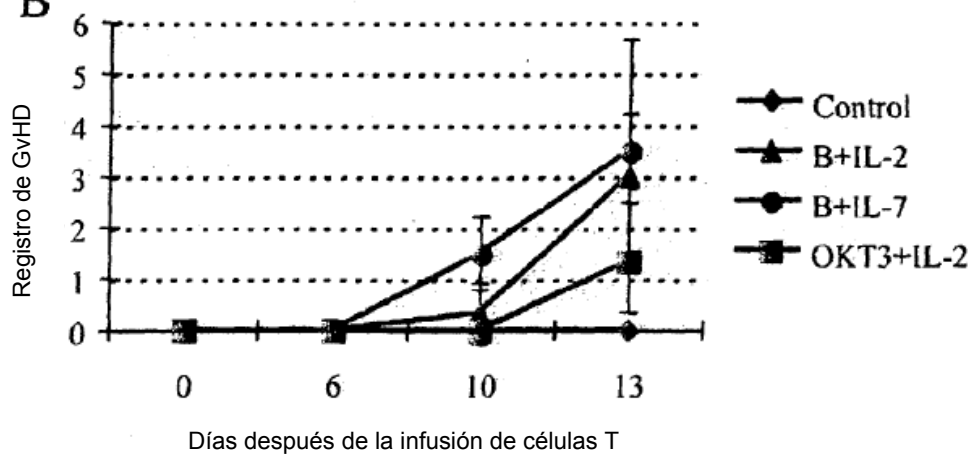


A

Fig. 38



B



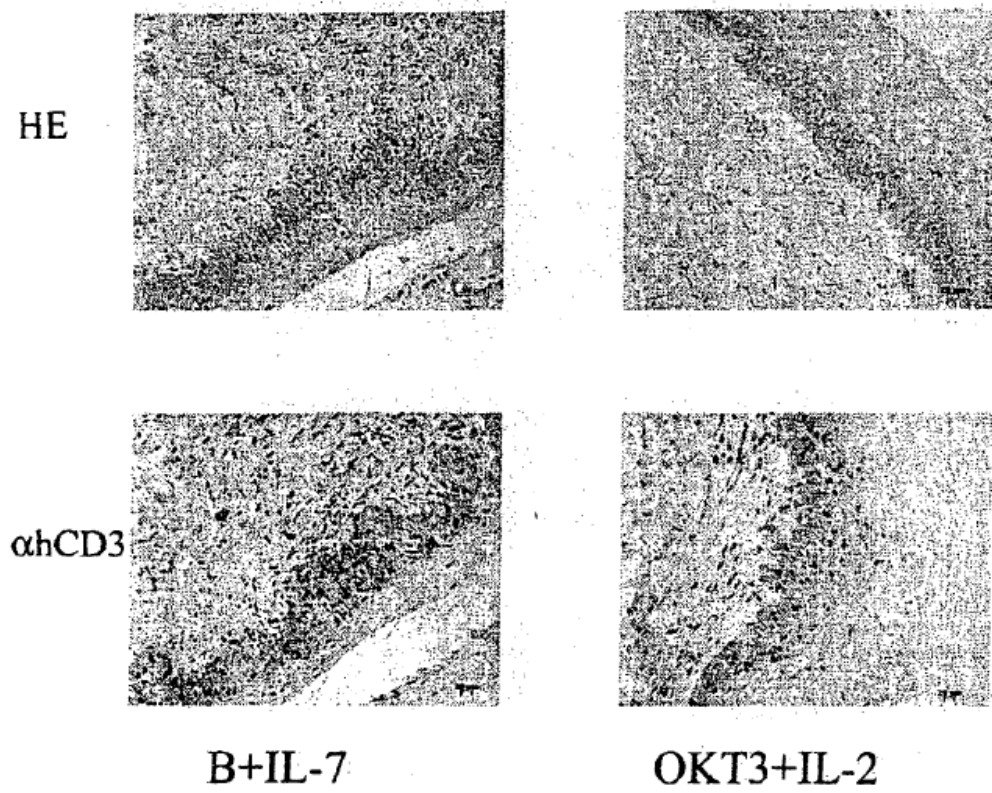


Fig. 39

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para comodidad del lector únicamente. No forma parte del documento de la patente europea. Aun cuando se tuvo gran cuidado al reunir las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes (EPO) declina toda responsabilidad a este respecto.

Los documentos de patente citados en la descripción

- US 20050074822 A [0003]

Literatura no de patentes citada en la descripción

- Jenkins, M.K.; A. Khoruts; E. Ingulli; D.L. Mueller; S.J. Mc Sorley; R.L. Reinhardt; A.Irano; K.A. Pape. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol*, 2001, vol.19, 23-45 [0065]
- Sprent, J.; C.D. Surh. T cell memory. *Annu Rev Immunol*, 2002, vol. 20, 551-579 [0065]
- Marrack, P.; J. Bender; D. Hildeman; M. Jordan; T.Mitchell; M. Murakami; A. Sakamoto; B.C. Schaefer; B. Swanson; J. Kappler. Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nat Immunol*, 2000, vol. 1, 107-111 [0065]
- Novak, E.J.; A.W. Liu; G.T. Nepom; W.W. Kwok. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J. Clin Invest*, 1999, vol. 104, R63-67 [0065]
- Mallone, R.; G.T. Nepom; MHC class II tetramers and the pursuit of antigen-specific T cells: define, deviate, delete. *Clin Immunol*, 1999, vol. 110, 232-242 [0065]
- Boursalian, T. E.; K. Bottomly. Survival of native CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J Immunol*, 2002, vol. 162, 3795-3801 [0065]
- Seddon, B.; R. Zamoska. TCR and IL-7 receptor signals can operate independently or synergize to promote lymphopenia-induced expansion of active T cells. *J Immunol*, 2002, vol. 169, 3752-3759 [0065]
- Sallusto, F.; D. Lenig; R. Foster; M. Lipp; A. Lanzavecchia. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, vol. 401, 708-712 [0065]
- Seddon, B.; P. Tomlinson; R. Zamoska. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol*, 2003, vol. 4, 680-686 [0065]
- Kondrack, R. M.; J. Harbortson; J.T. Tan; M. E. McBreen; C.D. Surh; L.M. Bradley. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med*, 2003, vol. 198, 1797-1806 [0065]
- Li, J.; G. Huston; S.L. Swain. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J. Exp Med*, 2003, vol. 198, 1807-1815 [0065]
- Lenz, D.C.; S.K. Kurz; E. Lemmens; S.P. Schoenberger; J. Sprent; M. B. Oldstone; D. Homann. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+ T cell memory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, Vol. 10 (1), 9357-9362 [0065]
- Geginat, J.; F. Sallusto; A. Lanzavecchia. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human native, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 2001, vol. 194, 1711-1719 [0065]
- Rivino, L.; M. Messi; D. Jarrossay; A. Lanzavecchia; F. Sallusto; J. Geginat. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th) 1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human Cd4+ central memory T cells. *J exp Med*, 2004, vol. 200, 725-735 [0065]
- Jaleco, S.; L. Swainson; V. Dardalhon; M. Burjanadze; S. Kinet; N. Taylor. Homeostasis of native and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, 2003, vol. 171, 61-68 [0065]
- Jameson, S.C. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2002, vol. 2, 547-556 [0065]
- Appelbaum, F. R. Hematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*, 2001, vol. 411, 385-389 [0065]
- Bonnini, C.; G. Ferrari; S. Verzeletti; P. Servida; E. Zappone; L. Ruggieri; M. Ponzoni; S. Rossini; F. Mavilio; C. Traversari. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*, 1997, vol. 276, 1719-1724 [0065]
- Fehse, B.; F.A. Ayuk; N. Kroger; L. Fang; K. Kuhlcke; M. Heinzlmann; T. Zabelina; A.A. Fauser; A.R. Zander. Evidence for increased risk of secondary graft failure after in vivo depletion of suicide

- gene-modified T Lymphocytes transplanted in conjunction with CD34+-enriched blood stem cells. *Blood*, 2004, vol. 104, 3408-3409 **[0065]**
- Tiberghien, P.; C. Ferrand; B. Lioure; N. Milpied; R. Angonin; E. Deconick; J. M. Certoux; E. Robinet; P. Saas; B. Petracca. Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood*, 2001, vol. 97, b3-72 **[0065]**
 - Verzeletti, S.; C. Bonini; S. Marktel; N. Nobili; F. Ciceri; C. Traversari; C. Bordignon. Herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer for controlled graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia: clinical follow-up and improved new vectors. *Hum Gene Ther*, 1998, vol. 9, 2243-2251 **[0065]**
 - Bondanza, A.; V. Valtolina; Z. Magnani; M. Ponzoni; K. Fleischhauer; M. Bonyhadi; C. Traversari; F. Sanvito; S. Toma; M. Radizzani. Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. *Blood*, 2005 **[0065]**
 - Sauce, D.; M. Bodinier; M. Garin; B. Petracca; N. Tonnelier; A. Duperrier; J. V. Melo; J.F. Apperley; C. Ferrand; P. Hervé. Retrovirus-mediated gene transfer in primary T Lymphocytes impairs their anti-Epstein-Barr virus potential through both culture-dependent and selection process-dependent mechanisms. *Blood*, 2002, vol. 99, 1165-1173 **[0065]**
 - Cavalieri, S.; S. Cazzaniga; M. Geuna; Z. Magnani; C. Bordignon; L. Naldini; C. Bonini. Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence. *Blood*, 2003, vol. 102, 4967-505 **[0065]**
 - Marktel, S.; Z. Magnani; F. Ciceri; S. Cazzaniga; S. R. Riddell; C. Traversari; C. Bordignon; C. Bonini. Immunologic potential of donor lymphocytes expressing a suicide gene for early immune reconstitution after hematopoietic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood*, 2003, vol. 101, 1290-1298 **[0065]**
 - Qasim, W.; A. Trasher; D. King; S. Verfuether; J. Buddle; H.B. Gaspar. Impact of retroviral gene transfer on T cell phenotype and function. *Blood*, 2002, vol. 100 (11 **[0065]**
 - Van Room, J.A.; C.A. Glaudemans; J. W. Bijlsma; F.P. Lafeber. Differentiation of naïve CD4+ T cells towards T helper 2 cells is not impaired in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*, 2003, vol. 5, R 269-76 **[0065]**
 - Depré, L.; S. Trifar; A. Follenzi; F. Marangoni; T. Lain de Lera; A. Bernad; S. Martino; S. Tsuchiya; C. Bordignon; L. Naldini. Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol Ther*, 2004, vol. 10, 903-15 **[0065]**