



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 382 775**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0783 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05858553 .0**

96 Fecha de presentación : **07.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1809321**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

54 Título: **Inmunoterapia adoptiva con supervivencia de linfocitos T potenciada.**

30 Prioridad: **08.10.2004 US 617340 P**
12.10.2004 US 617768 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2012

73 Titular/es:
Government of the United States of America
Office of Technology Transfer 6011
Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, Maryland 20852, US

72 Inventor/es: **Morgan, Richard, A.;**
Rosenberg, Steven, A. y
Hsu, Cary

74 Agente/Representante:
Miltenyi, Peter

ES 2 382 775 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

Inmunoterapia adoptiva con supervivencia de linfocitos T potenciada.

5 **Antecedentes de la invención**

Esta invención se refiere a la modificación de linfocitos T para terapia, investigación y otros usos. Las modificaciones de las células T potencian la supervivencia de linfocitos T.

10 La transferencia de linfocitos T adoptiva (inmunoterapia adoptiva) es la transferencia de linfocitos T a un sujeto para la terapia de una enfermedad. Tiene gran potencial para la terapia de una amplia variedad de enfermedades incluyendo cáncer y enfermedades infecciosas. La inmunoterapia adoptiva se aprovecha de la respuesta inmunitaria, en la que el linfocito T desempeña un papel central.

15 Se piensa a menudo que la respuesta inmunitaria tiene distintas fases. Estas fases se han denominado fases de iniciación, expansión, contracción y mantenimiento o memoria (Schuluns & Lefrancois, Nature Rev. 3: 269-79 (2003)). Después de que un antígeno sea reconocido, la respuesta inmunitaria se “inicia”. Esto va seguido de un rápido aumento en el número de células que participan en la respuesta inmunitaria durante la “fase de expansión”. Sin expansión, la respuesta inmunitaria tiende a ser ineficaz. La siguiente fase, la “fase de contracción”, controla el tamaño de la respuesta inmunitaria para prevenir una respuesta excesiva que podría dañar al huésped. La apoptosis, un tipo específico de muerte celular programada, es un importante proceso celular durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria. Si la contracción es excesiva, puede resultar una respuesta inmunitaria breve y/o débil. Finalmente, para una inmunidad sostenida, la respuesta inmunitaria debe entrar en la “fase de mantenimiento”, y generar “linfocitos T de memoria”.

25 Un obstáculo que limita la eficacia de la inmunoterapia adoptiva es la breve supervivencia de las células transferidas. Por ejemplo, la activación *in vitro* es una etapa frecuentemente empleada en la inmunoterapia adoptiva, pero linfocitos T activados *in vitro* tienden a experimentar apoptosis tras la transferencia *in vivo*. Se ha dado IL-2 a pacientes para estimular su respuesta inmunitaria en general, y para aumentar la inmunoterapia adoptiva. La IL-2 no potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria ni favorece la formación de linfocitos T de memoria, pero puede usarse para prolongar o continuar la fase de expansión. Sin embargo, la IL-2 tiene toxicidades significativas cuando se administra a pacientes y los pacientes no siempre pueden tolerar suficientes cantidades de IL-2 requeridas para una inmunoterapia adoptiva óptima. Las toxicidades asociadas con IL-2 a dosis alta incluyen escalofríos, náuseas, vómitos, diarrea y “síndrome de extravasación capilar” (que puede requerir cuidados intensivos). Además, los pacientes que se someten a terapia con IL-2 a dosis alta también reciben frecuentemente terapia profiláctica con antibióticos. Klebanoff *et al.* (PNAS vol. 7 (2004), págs. 1969-74) notifican la actividad antitumoral *in vivo* de células T CD8+ transfectadas con IL-15 y contemplan el uso de estas células en inmunoterapia adoptiva en seres humanos.

40 Lo anterior muestra que hay una necesidad de mejorar la inmunoterapia adoptiva.

La presente invención atenúa esta necesidad proporcionando linfocitos T con supervivencia potenciada durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria, y composiciones que comprenden los mismos. Ventajosamente, la invención atenúa las necesidades en la técnica mediante un método que puede evitar la toxicidad asociada con la terapia con IL-2 a dosis alta. Estas y otras ventajas de la invención, así como características aspectos inventivos adicionales, resultarán evidentes a partir de la descripción de la invención proporcionada en el presente documento.

Breve resumen de la invención

50 La invención proporciona linfocitos T que expresan un polinucleótido recombinante que codifica una citoquina-citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria, y composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que comprenden los mismos. Además, lo dado a conocer es un método de preparación de linfocitos T con supervivencia potenciada, que comprende la transformación, por ejemplo, transducción, de linfocitos T con un polinucleótido recombinante que codifica una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante las fases de contracción y mantenimiento de la respuesta inmunitaria. El método puede ponerse en práctica *in vivo*, o *ex vivo* y opcionalmente puede incluir además transferir las células transformadas, por ejemplo, transducidas, a un mamífero. Cuando los linfocitos T son transformados, por ejemplo, transducen, *ex vivo* y se transferidos a un mamífero receptor, el mamífero es preferiblemente el mismo mamífero del que se obtuvieron los linfocitos T (es decir, los linfocitos T son autólogos). Las composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, pueden usarse en el tratamiento de un estado médico, por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria e inmunodeficiencia. Las composiciones de la invención también pueden usarse *in vitro* para modificar cultivos celulares. Las composiciones de la invención también pueden almacenarse y usarse para proporcionar reactivos a los que pueden transferirse receptores de células T recombinantes (TCR) y otros restos, cada uno de los cuales tiene por sí mismo utilidad.

65 El polinucleótido recombinante transformado, por ejemplo, transducido, en los linfocitos T codifica preferiblemente una parte funcional, variante o fusión de IL-7, IL-15, o tanto IL-7 como IL-15, que por supuesto incluye IL-7 no modificada y/o IL-15.

Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

La figura 1 ilustra la actividad biológica de IL-15 expresada por células transformadas, según una realización de la invención. La figura 1A es un gráfico de la proliferación de células CTLL-2 (tal como se determina mediante la captación de ³H-timidina) en ausencia (barra izquierda) y en presencia (barra derecha) de IL-2. La figura 1B es un gráfico de la proliferación de células CTLL-2 en presencia de diferentes cantidades de IL-15 humana recombinante. La figura 1C es un gráfico de la proliferación de células CTLL-2 en presencia de sobrenadantes de células SupT1 que expresan el vector control MSGIN (◆), el vector MSGV-IL-15 (■) o el vector MSGV-Super IL-15 (▲).

La figura 2 ilustra la supervivencia de linfocitos de sangre periférica (PBL) *in vitro* tras la retirada de citoquinas, según una realización de la invención. Específicamente, la figura 2 es un gráfico del recuento celular (en millones) frente a los días de retirada de citoquinas para células no transducidas (UT (◆)) y células transducidas con un vector control (MSGIN (▲)), un vector que codifica IL-2-(■), IL-7-(■) o IL-15-(●).

La figura 3 ilustra la producción de interferón gamma por PBL transformados cuando se cultivan conjuntamente con células de melanoma, según una realización de la invención. Específicamente, la figura 3 es un gráfico del IFN- γ producido en respuesta a la exposición a células de melanoma (526 (barra negra continua), 624 (barra blanca continua), 888 (barra con bandas) y 938 (barra gris continua)) por células no transducidas (NV), células L2D8 (control positivo) o células transducidas con vectores que codifican un TCR (TCR), IL-2, IL-7 o IL-15.

La figura 4 ilustra la producción de interferón gamma por PBL transformados cuando se estimulan con antígeno (gp100), según una realización de la invención. Específicamente, la figura 4 es un gráfico del IFN- γ producido por PBL no transducidos (NV), o PBL transducidos con un vector que codifica un TCR, IL-2, IL-7 o IL-15, tras la exposición a células presentadoras de antígeno pulsadas con diferentes concentraciones de péptido gp100 (de 0 a 100 ng/ml).

La figura 5 es la secuencia de aminoácidos de una proteína IL-15 madura que ilustra la optimización de codones (SEQ ID NO: 10), según una realización de la invención. La proteína madura contiene 114 aminoácidos. Se reemplazan sesenta y tres codones por secuencias alternativas que codifican el mismo aminoácido. Diecinueve de las sustituciones resultan en un desplazamiento de un codón pocas veces utilizado (<20%) a un codón utilizado más frecuentemente.

La figura 6 es un gráfico de la cantidad de IL-15 producida por células NIH/3T3, según una realización de la invención. Se transdujeron células NIH/3T3 con diferentes cantidades de o bien un vector que comprende un gen de IL-15 salvaje (MSGV-IL-15; barras blancas) o bien un gen de IL-15 con codones optimizados (CO) (MSGV-CO IL-15; barras negras). Los datos son representativos de dos experimentos.

La figura 7 es un gráfico de la cantidad de IL-15 producida por células TE671, según una realización de la invención. Se transdujeron células TE671 con diferentes cantidades de o bien un vector que comprende un gen de IL-15 salvaje (MSGV-IL-15; barras blancas) o bien un gen de IL-15 con codones optimizados (CO) (MSGV-CO IL-15; barras negras). Los datos son representativos de dos experimentos.

La figura 8 es un gráfico de la cantidad de IL-15 producida por células 293T, según una realización de la invención. Se transdujeron células 293T con diferentes cantidades de o bien un vector que comprende un gen de IL-15 salvaje (MSGV-IL-15; barras blancas) o bien un gen de IL-15 con codones optimizados (CO) (MSGV-CO IL-15; barras negras). Los datos son representativos de dos experimentos.

La figura 9 es un gráfico de la cantidad de IL-15 producida por células transducidas con vectores que comprenden el gen de IL-15 salvaje (MSGV-IL-15; barras blancas) o con codones optimizados (MSGV-CO-IL-15; barras negras) a las diluciones de retrovirus indicadas, según una realización de la invención.

La figura 10 es un gráfico de la cantidad de ADN de β -actina detectada mediante PCR a partir de las células de la figura 9 transducidas con vectores que contienen el gen de IL-15 salvaje, según una realización de la invención.

La figura 11 es un gráfico de la cantidad de ADN de β -actina detectada mediante PCR a partir de las células de la figura 9 transducidas con vectores que contienen el gen de IL-15 con codones optimizados, según una realización de la invención.

La figura 12 es un gráfico de la cantidad de IL-15 producida por células no transducidas o transducidas con IL-15 aisladas de diferentes pacientes y estimuladas (barras negras) o no estimuladas con OKT3 (barras blancas), según una realización de la invención.

La figura 13 es un gráfico de los números de células a partir de la figura 12 en cultivo en ausencia de citoquina exógena, según una realización de la invención. Células no transducidas del paciente 1 ◇; células transducidas con IL-15 del paciente 1 ◆; células no transducidas del paciente 2 Δ; células transducidas con IL-15 del paciente 2 ▲; células no transducidas del paciente 3 ○; células transducidas con IL-15 del paciente 3 ●; células no transducidas del paciente 4 □; células transducidas con IL-15 del paciente 4 ■; células no transducidas del paciente 5 X; y células transducidas con IL-15 del paciente 5 *.

ES 2 382 775 T3

La figura 14 es un gráfico de los números de células (no transducidas ◇; transducidas con un vector control ■; o transducidas con vector de IL-15 ●) en cultivo durante más de 180 días, según una realización de la invención. AIB representa linfocitos transducidos con un vector control.

5 La figura 15 es una representación gráfica de la expresión de ciertas moléculas de la superficie celular por células no transducidas, células no transducidas cultivadas con IL-15 y células transducidas con IL-15, según una realización de la invención.

10 La figura 16 es una representación gráfica de la expresión de ciertas moléculas de la superficie celular por células no transducidas cultivadas en medios que contienen IL-2, células no transducidas cultivadas en medios que contienen IL-15 o células transducidas con IL-15, según una realización de la invención.

15 La figura 17 es un gráfico de la proliferación (tal como se determina mediante la captación de ³H-timidina) de células no transducidas, o células transducidas con un vector control o vector que codifica IL-15 en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de IL-2, según una realización de la invención.

20 La figura 18 es una representación gráfica a lo largo del tiempo de la tinción con 7-AAD/anexina-V de células no transducidas (UT), o células transducidas con un vector control (AIB) o un vector que codifica IL-15, células que se cultivan en ausencia de IL-2 y se estimulan mediante OKT3, según una realización de la invención.

La figura 19 es una representación gráfica de la expresión de Bcl-2 por células no transducidas (UT), o células transducidas con un vector control (AIB) o un vector que codifica IL-15, células que se cultivan en presencia (histogramas blancos) o ausencia (histogramas grises) de IL-2, según una realización de la invención.

25 La figura 20 es una representación gráfica de la expresión de Bcl-X_L por células no transducidas (UT), o células transducidas con un vector control (AIB) o un vector que codifica IL-15, células que se cultivan en presencia (histogramas blancos) o ausencia (histogramas grises) de IL-2, según una realización de la invención.

30 La figura 21 es un gráfico de líneas que representa el IFN-γ producido por células no transducidas (UT; ◆), o células transducidas con un vector control (AIB; ●) o con un vector que codifica IL-15 (IL-15; ■), en respuesta a la estimulación con células T2 pulsadas con cantidades variables de péptido gp100, según una realización de la invención.

35 La figura 22 es un gráfico del IFN-γ producido por células no transducidas (UT), o células transducidas con un vector control (AIB) o con un vector que codifica IL-15, en respuesta a la estimulación con células T2 pulsadas con diferentes péptidos antigénicos: péptido de virus de la gripe (Flu; barras blancas), péptido MART-1 (MART; barras grises) o péptido gp100 (gp100; barras negras), antes de retirar IL-2 de los medios de cultivo celular, según una realización de la invención.

40 La figura 23 es un gráfico del IFN-γ producido por células no transducidas (UT), o células transducidas con un vector control (AIB) o con un vector que codifica IL-15, en respuesta a la estimulación con células T2 pulsadas con diferentes péptidos antigénicos: péptido de virus de la gripe (Flu; barras blancas), péptido MART-1 (MART; barras grises) o péptido gp100 (gp100; barras negras), tras retirar IL-2 de los medios de cultivo celular, según una realización de la invención.

45 La figura 24 es un gráfico del número de células (no transducidas (UT; ◆), o transducidas con vectores de IL-2 (■), IL-7 (▲) o IL-15 (X)) que sobreviven *in vitro* tras haberse retirado la citoquina exógena de los medios de cultivo, según una realización de la invención. Las células estaban recién aisladas.

50 La figura 25 es un gráfico del número de células (no transducidas (UT; ◆), o transducidas con vector control MSGIN (■), vectores de IL-2 (▲), IL-7 (X) o IL-15 (*)) que sobreviven *in vitro* tras haberse retirado la citoquina exógena de los medios de cultivo, según una realización de la invención. Las células eran células crioconservadas descongeladas.

55 La figura 26 es un gráfico de la proliferación (tal como se determina mediante la captación de ³H-timidina) de células (no transducidas (UT; ◆), o transducidas con vector control MSGIN (■), vectores de IL-2 (▲), IL-7 (X) o IL-15 (*)) en respuesta a la estimulación con células dendríticas alogénicas, según una realización de la invención.

60 La figura 27 es un gráfico del número de células (no transducidas (◆), o transducidas con vectores que codifican IL-2 (▲), IL-7 (X) o IL-15 (*)) que sobreviven tras haberse retirado la citoquina exógena del medio de cultivo, según una realización de la invención.

65 La figura 28 es un gráfico de la proliferación (tal como se determina mediante la captación de ³H-timidina) de células no transducidas cultivadas en ausencia (■) o presencia de citoquinas exógenas: IL-2 (●), IL-7 (▲), IL-15 (●), tras la estimulación con diferentes proporciones de células dendríticas alogénicas, según una realización de la invención.

La figura 29 es un gráfico de la proliferación (tal como se determina mediante la captación de ³H-timidina) de células no transducidas (UT; ■), o células transducidas con un vector que codifica IL-2 (●), IL-7 (▲) o IL-15 (●), tras la estimulación con diferentes proporciones de células dendríticas alogénicas, según una realización de la invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención busca modular las fases de contracción y/o mantenimiento de la respuesta inmunitaria proporcionando linfocitos T que tienen una supervivencia potenciada. Por tanto, la invención busca equilibrar la proliferación celular y la muerte celular tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

La presente invención proporciona un linfocito T, o una población de los mismos, así como composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que comprenden los mismos. El linfocito T de la presente invención expresa al menos un polinucleótido recombinante que codifica al menos una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de una respuesta inmunitaria, en donde el polinucleótido comprende una secuencia no nativa, con codones optimizados que comprende SEQ ID NO 4 que codifica la citoquina, siendo la citoquina IL-15.

Para fines en el presente documento, el linfocito T puede ser cualquier linfocito T, tal como un linfocito T cultivado, por ejemplo, un linfocito T primario, o un linfocito T de una línea de células T cultivada, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc., o un linfocito T obtenido de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, el linfocito T puede obtenerse de numerosas fuentes, incluyendo pero sin limitarse a sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, el timo u otros tejidos o fluidos. Los linfocitos T también pueden enriquecerse o purificarse. Preferiblemente, el linfocito T es un linfocito T humano. Más preferiblemente, el linfocito T es un linfocito T aislado de un ser humano. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede ser de cualquier fase de desarrollo, incluyendo pero sin limitarse a linfocitos T doblemente positivos CD4⁺/CD8⁺, linfocitos T auxiliares CD4⁺, por ejemplo, células Th₁ y Th₂, linfocitos T CD8⁺ (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos), células mononucleares de sangre periférica (CMSP), leucocitos de sangre periférica (PBL), linfocitos infiltrantes de tumor (TIL), células T de memoria, linfocitos T vírgenes y similares. Preferiblemente, el linfocito T es un TIL o una CMSP.

Las presentes composiciones inventivas pueden comprender un único linfocito T o una población de los mismos. La población de linfocitos T puede ser una población heterogénea que comprende el linfocito T que expresa el polinucleótido recombinante que codifica la citoquina, además de al menos otra célula, por ejemplo un linfocito T que no expresa el polinucleótido recombinante que codifica la citoquina, o una célula distinta de un linfocito T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Alternativamente, la población de linfocitos T puede ser una población sustancialmente homogénea, en la cual la población principalmente comprende linfocitos T que expresan el polinucleótido recombinante que codifica la citoquina. La población puede ser también una población clonal de linfocitos T, en la que todos los linfocitos T de la población son clones de un único linfocito T que expresa un polinucleótido recombinante que codifica la citoquina, de manera que todos los linfocitos T de la población expresan el polinucleótido recombinante. Según una realización de la invención, se prefiere una población clonal.

El linfocito T de la presente invención o de las presentes composiciones inventivas expresan al menos un polinucleótido recombinante que codifica al menos una citoquina, tal como se comenta en el presente documento. En otras palabras, el linfocito T expresa una citoquina que está codificada por el polinucleótido recombinante. El polinucleótido recombinante puede codificar para más de una citoquina, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más citoquinas. Por ejemplo, el polinucleótido recombinante puede comprender un primer polinucleótido recombinante y un segundo polinucleótido recombinante. En una realización preferida, el 2º polinucleótido recombinante codifica IL-7, y el 1º polinucleótido recombinante codifica IL-15, de los mismos. Alternativamente, el polinucleótido recombinante puede comprender más de una copia de la secuencia codificante que codifica las citoquinas, por ejemplo, dos copias del gen de IL-15 en tándem.

Con respecto a la presente invención, el término “recombinante” se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de células vivas uniendo segmentos de ácido nucleico naturales o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que pueden replicarse en una célula viva, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de las descritas en (i) anteriormente. Para fines en el presente documento, la replicación puede ser replicación *in vitro*, replicación *in vivo* o síntesis *de novo*. El término “polinucleótido” tal como se usa en el presente documento incluye “oligonucleótido”, “ácido nucleico” y “molécula de ácido nucleico”, y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener un enlace internucleotídico natural, no natural o alterado, tal como un enlace fosforoamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. Se prefiere generalmente que el polinucleótido recombinante no comprenda ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. Sin embargo, puede ser adecuado en algunos casos, tal como se comenta en el presente documento, que el polinucleótido recombinante comprenda una o más inserciones, delecciones, inversiones y/o sustituciones.

Los polinucleótidos recombinantes pueden construirse basándose en reacciones de síntesis química y/o ligamiento enzimático usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (1994). Por ejemplo, puede sintetizarse químicamente un oligonucleótido usando nucleótidos que se producen de manera natural o nucleótidos modificados de manera diversa diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioa-

to y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar los polinucleótidos recombinantes incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3) w y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, uno o más de los polinucleótidos de la presente invención puede adquirirse de compañías tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

El término “aislado” tal como se usa en el presente documento significa que se ha retirado de su entorno natural. Los polinucleótidos de la presente invención pueden purificarse alternativa o adicionalmente. El término “purificado” tal como se usa en el presente documento significa que se ha aumentado su pureza, en el que “pureza” es un término relativo, y no debe interpretarse necesariamente como pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser al menos del 50%, puede ser mayor del 60%, el 70% o el 80%, o puede ser del 100%.

El polinucleótido recombinante puede codificar para cualquier citoquina, siempre que la citoquina tenga la capacidad para potenciar la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de una respuesta inmunitaria. Esta supervivencia potenciada durante la fase de contracción da como resultado una respuesta inmunitaria más eficaz y un aumento de la función de linfocitos T de memoria. Es preferible que la citoquina también facilite la formación y supervivencia de linfocitos T de memoria. Entre las citoquinas adecuadas están aquellas que prolongan la supervivencia de los linfocitos T durante la fase de contracción, de manera que, por ejemplo (pero sin limitarse a), cuando linfocitos de sangre periférica (PBL) se transforman (por ejemplo, transducen) con el polinucleótido recombinante, la citoquina producida puede mantener al menos aproximadamente el 25% de los PBL transducidos viables *in vitro* durante al menos 15 días, por ejemplo, cuando se cultivan en RPMI 1640, suplementado con suero humano normal al 5%, en ausencia de citoquinas añadidas, tales como IL-2. Preferiblemente, la citoquina producida mantiene al menos aproximadamente el 50%, por ejemplo, aproximadamente el 75% de los PBL transducidos viables *in vitro* en ausencia de citoquina añadida. Más preferiblemente, la citoquina producida mantiene el 90% o más de los PBL transducidos viables *in vitro* en ausencia de citoquina añadida. Tales citoquinas codificadas por el polinucleótido recombinante pueden ser, por ejemplo, IL-7, IL-15, IL-4, IL-12, IL-21 o IL-23. Preferiblemente, la citoquina es IL-7 o IL-15.

La interleucina-15 (IL-15) es una citoquina implicada en el desarrollo de células T. La IL-15 no se expresa normalmente por linfocitos T y normalmente la proporcionan otras células. Adicionalmente, se cree que la IL-15 se presenta de manera natural a los linfocitos T en la superficie de otras células (es decir, se presenta IL-15 a células T en trans).

La citoquina codificada por el polinucleótido recombinante puede comprender la citoquina de salvaje, de longitud completa, por ejemplo, IL-15 humana salvaje (SEQ ID NO: 6) o IL-7 humana salvaje (SEQ ID NO: 5), o una parte funcional, fusión funcional o variante funcional de la misma. Por “parte funcional” quiere decirse un fragmento o parte de la citoquina, por ejemplo, IL-7 o IL-15, fragmento o parte que conserva la actividad biológica de la citoquina. Partes funcionales de la citoquina, por ejemplo IL-7 o IL-15, abarcan, por ejemplo, aquellas partes de la citoquina que conservan la capacidad para potenciar la supervivencia de linfocitos T en un grado similar, el mismo grado o en un mayor grado que la citoquina de tipo natural, de longitud completa.

El término “fusión funcional” tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína de fusión o proteína quimérica que comprende una citoquina de salvaje, de longitud completa, por ejemplo, IL-7 o IL-15, o una parte funcional de la misma, fusionada a otra proteína o parte de la misma. La fusión funcional, como la parte funcional, conserva la actividad biológica de la citoquina, por ejemplo, la capacidad para potenciar la supervivencia de linfocitos T en un grado similar, el mismo grado o en un mayor grado que la citoquina de tipo natural, de longitud completa. La otra proteína a la que la citoquina, o parte funcional o variante de la misma se fusiona puede ser cualquier proteína. Estrictamente a modo de ejemplo, la proteína puede ser una proteína marcadora, que facilita ensayar los niveles de expresión de la fusión funcional.

El término “variante funcional” tal como se usa en el presente documento es sinónimo a “variante biológicamente equivalente”, “derivado biológicamente equivalente” o “análogo biológicamente equivalente”, y se refiere a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos salvaje de la citoquina, por ejemplo, IL-7 o IL-15, que comprende al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácido. La variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos salvaje de IL-7 o IL-15 que comprende al menos una sustitución de aminoácido conservativa.

Las partes, fusiones o variantes funcionales de IL-7 y IL-15 también incluyen polipéptidos que, cuando se expresan por linfocitos T transformados, por ejemplo, transducidos, pueden acoplar sus receptores respectivos e iniciar la transducción de señales. Los ejemplos de partes funcionales de IL-7 incluyen polipéptidos que carecen de péptidos señal salvaje (Namen *et al.*, patente estadounidense n.º 4.965.195). Adicionalmente, puede fusionarse una etiqueta de epítipo, tal como la etiqueta FLAG, a IL-7 sin pérdida de la función de IL-7 (Namen *et al.*, patente estadounidense n.º 4.965.195). Además, por ejemplo (pero sin limitarse a), la mutación del triptófano en el aminoácido 143 de IL-7 a tirosina o fenilalanina da como resultado variantes funcionales de IL-7 (vander Speck *et al.*, Cytokine 17: 227 (2002)).

ES 2 382 775 T3

Se ha mostrado que partes de la secuencia que codifica IL-15 que carece de las secuencias de algunos o todos los supuestos codones de iniciación en el sentido de 5' producen polipéptidos de IL-15 funcionales. De manera similar, fusiones del polipéptido de IL-15 con, por ejemplo (pero sin limitarse a) el péptido señal de CD33 o la secuencia líder de preprolactina, producen polipéptidos de IL-15 funcionales. Además, ciertos aminoácidos pueden mutarse sin efecto funcional. Por ejemplo (pero sin limitarse a), es improbable que la lisina en el aminoácido 35 de IL-15 humana sea importante para su función (Pettit *et al.*, J. Bio. Chem. 272: 2312-2318 (1997)) y mutaciones en esta posición normalmente todavía producen un polipéptido de IL-15 funcional.

También pueden obtenerse fácilmente variantes de IL-7 e IL-15 que pueden potenciar la supervivencia de linfocitos T sustituyendo un aminoácido por un aminoácido en una posición no esencial de la secuencia de o bien IL-7 o bien IL-15, o delecionando 1, 2, 3, 4, 4-10 u 11-30 aminoácidos no esenciales. De manera similar, puede añadirse 1, 2, 3, 4, 4-10 u 11-30 aminoácidos en regiones no esenciales del polipéptido.

Además, pueden reemplazarse aminoácidos esenciales por aminoácidos neutros o conservativos. El experto en la materia considerará deseablemente el contexto en el que se realiza cualquier sustitución de aminoácido particular, además de considerar la hidrofobicidad o polaridad de la cadena lateral, el tamaño general de la cadena lateral y el valor de pK de cadenas laterales con carácter ácido o básico en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, a menudo se sustituyen adecuadamente lisina, arginina e histidina entre sí, y más a menudo arginina e histidina. Tal como se conoce en la técnica, esto se debe a que los tres aminoácidos tienen cadenas laterales básicas, mientras que el valor de pK para las cadenas laterales de lisina y arginina está mucho más próximo entre sí (aproximadamente 10 y 12) que la histidina (aproximadamente 6). De manera similar, a menudo se sustituyen adecuadamente glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina entre sí, con la condición de que la glicina frecuentemente no se sustituye adecuadamente por los otros miembros del grupo. Esto se debe a que cada uno de estos aminoácidos es relativamente hidrófobo cuando se incorpora en un polipéptido, pero la carencia de la glicina de un carbono α permite a los ángulos de rotación phi y psi (alrededor del carbono α) tanta libertad conformacional que residuos de glicinilo pueden desencadenar cambios en la conformación o estructura secundaria que no se producen a menudo cuando los otros aminoácidos se sustituyen entre sí. Otros grupos de aminoácidos frecuentemente sustituidos adecuadamente entre sí incluyen, pero no se limitan a, el grupo que consiste en ácido glutámico y aspártico; el grupo que consiste en fenilalanina, tirosina y triptófano; y el grupo que consiste en serina, treonina y, opcionalmente, tirosina. Adicionalmente, el experto en la materia puede agrupar fácilmente aminoácidos sintéticos con aminoácidos que se producen de manera natural.

La IL-7 o IL-15 variante de la invención comprende preferiblemente al menos aproximadamente el 70% de aminoácidos idénticos a IL-7 o IL-15 no modificada. Además, los polipéptidos deseablemente no difieren en longitud (es decir, debido a mutaciones por deleción) en más de aproximadamente el 10%.

El polinucleótido recombinante puede comprender la secuencia codificante salvaje, que se produce de manera natural, de una citoquina. Alternativamente, el polinucleótido recombinante puede comprender una secuencia codificante no nativa que codifica para la citoquina. Por "no nativa" quiere decirse que la secuencia codificante no se produce en la naturaleza y es sinónimo a "no natural". La secuencia codificante puede comprender cualquier número de inserciones, deleciones y/o sustituciones, sustituciones que pueden provocar o no un cambio en los aminoácidos, por ejemplo, una mutación silenciosa. En algunos casos, es preferible que las sustituciones no provoquen un cambio en los aminoácidos, es decir, que sean una mutación silenciosa.

La secuencia codificante no nativa del polinucleótido recombinante puede ser una secuencia que se ha sometido a optimización de codones, es decir, la secuencia codificante no nativa es un producto de optimización de codones. La optimización de codones es una estrategia en la que codones dentro de un gen clonado, codones que generalmente no se usan por el sistema de traducción de la célula huésped, denominados "codones raros", se cambian mediante mutagénesis *in vitro* a codones preferidos sin cambiar los aminoácidos de la proteína sintetizada (Bradel-Tretheway *et al.*, J Viral Meth 111: 145-156 (2003); Ftamakrishna *et al.*, J Virol 78: 9174-9189 (2004)). Además, el polinucleótido recombinante que codifica la citoquina puede modificarse adicionalmente, por ejemplo, optimizarse sus codones, para mejorar el plegamiento del ARN, de manera que el plegamiento del transcrito de ARN codificado por el polinucleótido recombinante se minimiza. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree actualmente que la energía libre minimizada pronosticada, tal como se determina mediante, por ejemplo, programas informáticos de modelado molecular, se correlaciona con el plegamiento minimizado del ARN, lo que, a su vez, facilita la unión del ribosoma al ARN y permite una expresión eficaz del ARN. Preferiblemente, la secuencia codificante no nativa tiene el 90% o menos de la energía libre pronosticada de la secuencia codificante nativa. En otras palabras, se pronostica que la secuencia codificante no nativa tiene una energía libre que es el 90% o menos de la energía libre pronosticada de la secuencia codificante nativa. Más preferiblemente, la secuencia codificante no nativa tiene el 50% o menos de la energía libre pronosticada de la secuencia codificante nativa. Lo más preferible, la secuencia codificante no nativa tiene el 25% o menos de la energía libre pronosticada de la secuencia codificante nativa.

Pueden optimizarse los codones de una secuencia de nucleótidos dada a través del uso de programas informáticos disponibles públicamente, tales como "Ugene: A Web-based DNA codon optimizer algorithm", disponible en Internet en el sitio web del Centro de Vacunas Recombinantes ("*Recombinant Vaccine Center*") en el Instituto de Medicina Molecular ("*Molecular Medicine Institute*") de la Universidad de Pittsburgh, y "Codon Optimizer Tool", que es un programa gratuito disponible en Internet. Alternativamente, una secuencia de nucleótidos puede optimizarse a través de los servicios de compañías tales como Blue Heron Bio, Inc. (Bothell, Washington) y GenScript Corp. (Piscataway, NJ).

Por ejemplo, los polinucleótidos recombinantes que codifican IL-7, IL-15, partes, fusiones o variantes de las mismas, pueden modificarse para tener codones alternativos. Por ejemplo, pueden reemplazarse codones “raros” por codones más comúnmente empleados en el genoma de los mamíferos de los que se obtiene el linfocito T transformado. De este modo, la eficacia de la expresión de la IL-7, IL-15 y/o partes, fusiones o variantes de las mismas puede modificarse ventajosamente. Por tanto, la invención proporciona un polinucleótido recombinante que codifica IL-7 (SEQ ID NO: 1) o IL-15 (SEQ ID NO: 2) con codones optimizados expresado en un linfocito T para potenciar su supervivencia.

Puede sintetizarse un polinucleótido recombinante y usarse para reemplazar secuencias codificantes de un gen de citoquina salvaje. Por ejemplo, SEQ ID NO: 3 es un inserto de polinucleótido sintetizado *in vitro*, con codones optimizados, que se usa para reemplazar la secuencia codificante en un polinucleótido de IL-15 recombinante. SEQ ID NO: 4 muestra un polinucleótido recombinante que comprende la secuencia de un polinucleótido modificado por ingeniería genética que codifica IL-15 humana con codones específicos optimizados y plegamiento del ARN optimizado para la entrada al ribosoma. Además, los polinucleótidos recombinantes de la invención que codifican formas de IL-7 o IL-15 o partes, fusiones o variantes de las mismas, incluyen ácidos ribonucleicos, ácidos desoxirribonucleicos y ácidos nucleicos peptídicos. En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido recombinante que comprende una secuencia codificante no nativa que codifica la citoquina que se ha sometido a optimización de codones comprende SEQ ID NO: 4.

Con respecto a la presente invención, el polinucleótido recombinante puede comprender otros ácidos nucleicos distintos de la secuencia codificante de la citoquina. El polinucleótido recombinante puede comprender, por ejemplo, un gen suicida, entre otros genes o elementos de expresión, por ejemplo, promotores, inductores, potenciadores, marcadores y similares. Preferiblemente, el polinucleótido recombinante comprende un gen suicida. Tal como se usa en el presente documento, el término “gen suicida” se refiere a un gen que provoca que la célula que expresa el gen suicida muera. El gen suicida puede ser un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo, un fármaco, sobre la célula en la que el gen se expresa, y provoca que la célula muera cuando la célula entra en contacto con o se expone al agente. Se conocen en la técnica genes suicidas (véase, por ejemplo, *Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews*, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, RU), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el gen de timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), citosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa y nitrorreductasa. Preferiblemente, el gen suicida es el gen de TK del VHS. En este caso, el agente al que la célula se sensibiliza es el fármaco ganciclovir.

Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se cree que la expresión de la citoquina codificada por el polinucleótido recombinante por el linfocito T confiere al presente linfocito T de la invención propiedades deseables, que hacen que el linfocito T sea especialmente útil en métodos de tratamiento o prevención de un estado médico, por ejemplo, una enfermedad, en un ser humano. En este sentido, la presente invención proporciona linfocitos T que tienen tales propiedades deseables, incluyendo, por ejemplo, supervivencia potenciada o viabilidad *in vitro* en ausencia de cualquier citoquina añadida o exógena en el medio de cultivo. En una realización preferida, el linfocito T de la presente invención tiene la capacidad para sobrevivir *in vitro* en ausencia de una citoquina exógena o añadida, tal como IL-2, durante al menos 20 días. En otras palabras, el linfocito T puede vivir durante 20 días o más *in vitro* en un medio de cultivo que carece de cualquier citoquina exógena o añadida. Más preferiblemente, el linfocito T tiene la capacidad para sobrevivir *in vitro* en ausencia de una citoquina exógena o añadida durante al menos 40 días. Lo más preferiblemente, el linfocito T puede sobrevivir *in vitro* en ausencia de citoquina exógena o añadida durante al menos 180 días.

La presente invención también proporciona un linfocito T que puede proliferar en ausencia de cualquier citoquina exógena o añadida, por ejemplo, IL-2. Además, la presente invención proporciona un linfocito T que puede resistir la apoptosis inducida por la retirada de IL-2 *in vitro*. Además, la presente invención proporciona un linfocito T que tiene la capacidad para reconocer un antígeno *in vitro* en ausencia de una citoquina exógena o añadida.

Los linfocitos T, o poblaciones de los mismos, así como las composiciones que comprenden los mismos, tienen muchos usos. Los usos preferidos incluyen el tratamiento o la prevención de un estado médico, por ejemplo, una enfermedad tal como cáncer, enfermedad infecciosa y enfermedad autoinmunitaria, o inmunodeficiencia. En este sentido, los linfocitos T de la presente invención o de las presentes composiciones de la invención pueden comprender otros componentes celulares que ayudan en la capacidad del linfocito T para tratar o prevenir un estado médico. Por ejemplo, el linfocito T puede comprender un receptor específico para un antígeno de un estado médico. El receptor puede ser un receptor específico de antígeno que reconoce cualquier antígeno que es característico del estado médico, por ejemplo, enfermedad, que va a tratarse o prevenirse, tal como se comenta en el presente documento.

El receptor puede ser el receptor de células T endógeno, es decir, el receptor de células T específico de antígeno que es endógeno o nativo para (que se produce de manera natural en) el linfocito T. En tal caso, el linfocito T que comprende el receptor de células T endógeno puede ser un linfocito que se aisló de un mamífero, que se sabe que expresa el antígeno específico del estado médico particular. En una realización preferida, el mamífero puede ser un mamífero que se inmuniza con un antígeno de, o específico para, un estado médico, por ejemplo, una enfermedad. Deseablemente, el mamífero se inmuniza antes de obtener los linfocitos T del mamífero. De este modo, las células transformadas con el polinucleótido que puede expresar la citoquina pueden incluir células en las que se induce que tengan especificidad por el estado médico que va a tratarse, o pueden incluir una proporción superior de células específicas para el estado médico. Los linfocitos T así obtenidos del mamífero pueden transformarse entonces, por

ejemplo transducirse, con el polinucleótido recombinante que codifica la citoquina, prepararse para su reintroducción en un mamífero que tiene el estado médico y reintroducirse en el mamífero, tal como se comentó anteriormente en el presente documento.

5 El linfocito T que comprende el receptor de células T endógeno puede ser una célula T que se obtuvo de un mamífero que ya tiene el estado médico, por ejemplo, enfermedad, que va a tratarse. De este modo, los linfocitos T obtenidos del mamífero incluyen linfocitos T que tienen especificidad por los antígenos, las células o los tejidos del estado médico, por ejemplo, enfermedad (o que albergan el agente etiológico de la enfermedad). En esta realización, los linfocitos T preferiblemente se seleccionan o clasifican para la especificidad deseada y opcionalmente se expanden
10 *in vitro*, antes de su reintroducción en el mismo u otro mamífero.

Alternativamente, el linfocito T que comprende el receptor de células T endógeno puede ser un linfocito T dentro de una población mixta de células aisladas de un mamífero, y la población mixta puede exponerse al antígeno que se reconoce por el receptor de células T endógeno, mientras que está cultivándose *in vitro*. De esta manera, el linfocito
15 T que comprende el receptor que reconoce el antígeno específico del estado médico se expande o prolifera *in vitro*, aumentando de ese modo el número de linfocitos T que tienen el receptor específico de antígeno endógeno.

El receptor que es específico para el antígeno específico del estado médico puede ser alternativamente un receptor quimérico recombinante que es específico para un antígeno de un estado médico. Por ejemplo, el receptor puede ser uno que está codificado por un polinucleótido recombinante que se expresa por el linfocito T. El polinucleótido recombinante que codifica el receptor quimérico puede comprender, por ejemplo, una parte de unión a antígeno, tal como partes de unión a antígeno de inmunoglobulinas (por ejemplo, que se producen de manera natural y sintéticas, por ejemplo, modificadas por ingeniería genética, anticuerpos o partes de los mismos, scFv, etc.), receptores de células T, receptores de células B y similares, además de otra parte que no funciona uniéndose al antígeno. Tales receptores
20 quiméricos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Hwu *et al.*, JEM 178: 361-366 (1993); Darcy *et al.*, J. Immunology 164: 3705-3712 (2000); Haynes *et al.*, J. Immunology 166: 182-187 (2001); Dakappagari *et al.*, Can Res 60: 3782-3789 (2000); y Weijtens *et al.*, J. Immunology, 157: 836-843 (1996).

Por ejemplo, los linfocitos T transformados, por ejemplo, transducidos, mediante el polinucleótido recombinante
30 que codifica citoquina también pueden transformarse, por ejemplo, transducirse, con polinucleótidos que codifican un receptor de células T (TCR) exógeno (por ejemplo, recombinante) u otro receptor quimérico recombinante. Tales receptores quiméricos exógenos, por ejemplo, TCR quiméricos, pueden conferir especificidad por antígenos adicionales al linfocito T transformado más allá de los antígenos para los que el receptor de células T endógeno es específico de manera natural. Esto puede dar como resultado, pero no necesariamente, la producción de linfocitos T que tienen
35 especificidades de antígeno dobles.

Puede usarse cualquier polinucleótido adecuado que codifica un receptor quimérico, TCR o proteína de tipo TCR. Se conocen en la técnica TCR para su uso en esta realización. Por ejemplo, se han usado polinucleótidos que codifican TCR para gp100, NY-ESO-1 y MART-1 en inmunoterapia. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 5.830.755, Zhao *et al.*, J. Immunology 174 (7): 4415-23 (2005); y Hughes *et al.*, Hum Gene Ther. 16(4): 457-472 (2005). En estas realizaciones, la transformación con el polinucleótido recombinante que codifica citoquina puede producirse antes, después o simultáneamente con la transformación del receptor de células T. El TCR codificado por los ácidos nucleicos transformados puede ser de cualquier forma adecuada incluyendo por ejemplo un TCR monocatenario o una fusión con otras proteínas (por ejemplo, sin limitación de moléculas coestimuladoras).
45

El antígeno de una enfermedad, antígeno que se reconoce por el receptor de células T endógeno o receptor quimérico recombinante, puede ser cualquier antígeno que es característico de una enfermedad o un estado médico. Por ejemplo, el antígeno puede ser, pero no se limita a, un antígeno tumoral (también denominado antígeno asociado a tumor) o un antígeno viral. Se conocen en la técnica antígenos tumorales e incluyen, por ejemplo, gp100, MART-1,
50 TRP-1, TRP-2, tirosinasa, NY-ESO-1 (también conocido como CAG-3), MAGE-1, MAGE-3, etc. También se conocen en la técnica antígenos virales e incluyen, por ejemplo, cualquier proteína viral, por ejemplo, env, gag, pol, gp120, timidina quinasa y similares.

La enfermedad o estado médico, que está asociado con o se caracteriza por el antígeno reconocido por el receptor de células T endógeno o receptor quimérico, puede ser cualquier enfermedad o estado médico. Por ejemplo, la enfermedad o estado médico puede ser un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria o una inmunodeficiencia, tal como se comenta en el presente documento.
55

Para fines de la presente invención, el cáncer puede ser cualquier cáncer. Tal como se usa en el presente documento, el término "cáncer" quiere decir cualquier crecimiento maligno o tumor provocado por división celular anómala y no controlada que puede propagarse a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo. El cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de vejiga urinaria, linfoma no Hodgkin, melanoma, cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de la cavidad oral, cáncer de faringe, cáncer de ovarios, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de cerebro, mieloma múltiple,
65 cáncer de esófago, cáncer de hígado, cáncer cervical, cáncer de laringe, cáncer del conducto biliar intrahepático, leucemia mieloide aguda, cáncer de tejidos blandos, cáncer de intestino delgado, cáncer testicular, leucemia linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin, cáncer mieloide crónico, cáncer linfocítico agudo, cáncer del ano, canal anal o anorrectal, cáncer de la vulva o cáncer del cuello uterino, vesícula biliar, pleura, mesotelioma maligno, cáncer de huesos, cáncer de

las articulaciones, cáncer de hipofaringe, cáncer del ojo, cáncer de la nariz, cavidad nasal, cuello u oído medio, cáncer de nasofaringe, cáncer de uréteres, cáncer de peritoneo, epiplón o mesenterio, o tumor carcinoide gastrointestinal. Un ejemplo específico de cáncer es melanoma.

5 Para fines en el presente documento, “enfermedad infecciosa” significa una enfermedad que puede transmitirse de persona a persona o de organismo a organismo, y está provocada por un agente microbiano (por ejemplo, resfriado común). Se conocen en la técnica enfermedades infecciosas e incluyen, por ejemplo, hepatitis, enfermedades de transmisión sexual (por ejemplo, clamidia, gonorrea), tuberculosis, VIH/SIDA, difteria, hepatitis B, hepatitis C, cólera y gripe.

10 Para fines en el presente documento, “enfermedad autoinmunitaria” se refiere a una enfermedad en la que el cuerpo produce una respuesta inmunógena (es decir, sistema inmunitario) frente a algún constituyente de su propio tejido. En otras palabras, el sistema inmunitario pierde su capacidad para reconocer algún tejido o sistema dentro del cuerpo como “propio” y los selecciona como diana y ataca como si fueran extraños. Las enfermedades autoinmunitarias pueden clasificarse en aquéllas en las que se ve afectado predominantemente un órgano (por ejemplo, anemia hemolítica y tiroiditis anti-inmunitaria), y aquéllas en las que el proceso de la enfermedad autoinmunitaria se difunde a través de muchos tejidos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico). Por ejemplo, se cree que la esclerosis múltiple está provocada por células T que atacan a las vainas que rodean a las fibras nerviosas del cerebro y la médula espinal. Esto da como resultado pérdida de coordinación, debilidad y visión borrosa. Se conocen en la técnica enfermedades auto-
 15 inmunitarias e incluyen, por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumática, anemia hemolítica, tiroiditis anti-inmunitaria, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis, diabetes, esclerodermia, psoriasis y similares.

25 Para fines en el presente documento, “inmunodeficiencia” significa el estado de un paciente cuyo sistema inmunitario se ha visto comprometido por una enfermedad o por la administración de productos químicos. Este estado hace que el sistema sea deficiente en el número y tipo de células sanguíneas necesarias para defenderse contra una sustancia extraña. Se conocen en la técnica enfermedades o estados de inmunodeficiencia e incluyen, por ejemplo, SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), SCID (enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave), deficiencia en IgA selectiva, inmunodeficiencia variable común, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de hiper-IgM y diabetes.

30 La presente invención también proporciona un método de preparación de un linfocito T con supervivencia de células T potenciada, por ejemplo, un linfocito T tal como se describió anteriormente en el presente documento. El método comprende poner en contacto un linfocito T con un polinucleótido recombinante que codifica una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de una respuesta inmunitaria, de manera que la puesta en contacto conduce a la expresión de la citoquina por el linfocito T.

35 Puede usarse cualquier medio adecuado para poner en contacto o transferir el/los polinucleótido(s) recombinante(s) transferido(s) a los linfocitos T. Los ejemplos de tales medios incluyen, pero no se limitan a, el uso de un lípido, una proteína, una partícula u otra molécula que puede facilitar la transformación de las células con el polinucleótido. El polinucleótido puede portarse en un plásmido o un vector viral. Los vectores virales adecuados incluyen vectores adenovirales, lentivirales, de virus adenoasociados, de la viruela y del herpes. Vectores virales son preferiblemente retrovirales y derivados de un virus que transduce eficazmente linfocitos T.

45 La transformación de linfocitos T, por ejemplo, transducción, altera genéticamente los linfocitos T dando como resultado que los linfocitos T posean un polinucleótido recombinante que codifica una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria. Aunque los linfocitos T preferiblemente se modifican por ingeniería genética para que codifiquen para y expresen tales citoquinas (es decir, no simplemente linfocitos T alterados para que alberguen tales polipéptidos de citoquina), la expresión de las citoquinas puede o bien regularse de manera condicional o bien ser constitutiva. La alteración genética puede conducir a un cambio permanente en el ADN de la línea germinal del linfocito T, o puede ser un cambio temporal. En algunos casos, la alteración genética de la invención preferiblemente no es un cambio permanente en el ADN de la línea germinal del mamífero del que se deriva el linfocito T, a menos que la alteración genética se produzca en una célula precursora para el linfocito T, tal como en una célula madre hematopoyética o un progenitor de linfocitos T de linaje restringido. La citoquina expresada por el polinucleótido actúa preferiblemente sobre la célula que secreta la citoquina y/o linfocitos T ubicados conjuntamente.

50 Pueden obtenerse células madre hematopoyéticas de, por ejemplo (pero sin limitarse a), médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical. Además, puede enriquecerse una población de células madre hematopoyéticas mediante el tratamiento de un mamífero con infusión de G-CSF o purificarse con, por ejemplo, anticuerpos tales como CD34. De manera similar, pueden obtenerse precursores de linfocitos T de linaje restringido de tejidos tales como, pero sin limitarse a, el timo mediante métodos conocidos en la técnica. Adicionalmente, pueden enriquecerse precursores de linfocitos T de linaje restringido mediante tratamientos tales como pero sin limitarse a linfopoyetina estromal tímica o protocolos de purificación, tales como pero sin limitarse a la selección de células CD4+/CD8+.

65 Los polinucleótidos recombinantes usados en de la presente invención son preferiblemente exógenos para las células que transforman. Adicionalmente, los polinucleótidos recombinantes de la presente invención están preferiblemente “aislados”, de manera que el polinucleótido recombinante se retira de su entorno o estado natural.

Los polinucleótidos recombinantes descritos en el presente documento comprenden preferiblemente una región codificante operativamente unida a un promotor adecuado, promotor que es preferiblemente funcional en células T. Promotores virales tales como, sin limitación, el promotor de CMV tardío principal, el promotor de VRS y el promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas están entre los promotores preferidos útiles en el contexto de la invención. Los promotores no virales adecuados incluyen, pero no se limitan a, el promotor de fosfoglicerocinasa (PGK) y el promotor del factor de elongación 1α . Promotores no virales son deseablemente promotores humanos. Elementos genéticos adecuados adicionales conocidos en la técnica también pueden ligarse a, unirse a o insertarse en el ácido nucleico y los constructos de la invención para proporcionar funciones adicionales, nivel de expresión o patrón de expresión. También pueden usarse los promotores nativos para la expresión de los genes de citoquinas, en cuyo caso preferiblemente no se usan en el cromosoma que codifica de manera natural para los mismos a menos que se modifique mediante un procedimiento que cambia sustancialmente ese cromosoma. Tales cromosomas sustancialmente cambiados pueden incluir cromosomas transfectados y alterados mediante un vector retroviral o procedimiento similar. Alternativamente, cromosomas cambiados sustancialmente pueden comprender un cromosoma artificial tal como un HAC, YAC o BAC.

Los polinucleótidos recombinantes descritos para la presente invención pueden insertarse en cualquier vector adecuado. Los vectores adecuados incluyen sin limitación vectores virales. Los vectores virales adecuados incluyen, sin limitación, vectores retrovirales, vectores alfavirales, de virus vaccinia, adenovirales, de virus adenoasociados, de virus del herpes y de virus de la viruela aviar, y tienen preferiblemente una capacidad nativa o modificada por ingeniería genética para transformar células T. Adicionalmente, los vectores útiles en el contexto de la invención pueden ser vectores de ácido nucleico "desnudo" (es decir, vectores que tienen pocas o ninguna proteína, azúcar y/o lípidos encapsulándolos), o acompañado con otras moléculas. Otras moléculas que pueden combinarse adecuadamente con los ácidos nucleicos de la invención incluyen sin limitación envueltas virales, lípidos catiónicos, liposomas, poliaminas, partículas de oro y restos de direccionamiento tales como ligandos, receptores o anticuerpos que seleccionan como diana moléculas celulares. Un vector preferido proporcionado por la invención comprende una parte de la LTR del virus de células madre murinas o un análogo conocido de la misma. Se prefieren más vectores que comprenden además la región gag y el sitio de corte y empalme env, que se obtienen preferiblemente del vector SFGtcLuc+ITE4- (que se conocen en la técnica). Estos vectores pueden usarse opcionalmente para transfectar linfocitos T *in vivo*.

Además, para optimizar la capacidad de los vectores, y particularmente vectores virales, para entrar en la célula mediante el método de la invención, el método se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el vector particular que está introduciéndose intracelularmente, que podrían impedir la transducción de células diana. El experto puede probar de manera rutinaria la presencia de tales anticuerpos neutralizantes. También se conocen en la técnica técnicas para prevenir que la presencia de anticuerpos neutralizantes impida la producción de proteínas eficaz (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 96/12406).

El polinucleótido recombinante de la invención puede codificar para dos citoquinas en un único polipéptido. Es conveniente, sin embargo, incorporar ácidos nucleicos que codifican partes de dos citoquinas (o partes, fusiones o variantes de las mismas) en un único vector, en el que incluso cada uno de los dos polinucleótidos recombinantes puede estar independientemente en cualquiera de los seis marcos de lectura, y colocarse de manera proximal o distal entre sí. Cuando los dos polinucleótidos recombinantes se colocan de manera proximal entre sí en un vector, a menudo es conveniente dirigir la expresión de ambos polinucleótidos recombinantes a partir de un único promotor e incluir un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) 5' para la traducción de la segunda secuencia codificante. Alternativamente, puede usarse un segundo promotor, tal como un promotor de fosfoglicerol cinasa (PGK) (Morgan *et al.*, J. Immunol., 1171: 3287-3295 (2003)) para dirigir la expresión del segundo constructo de ácido nucleico.

Para fines de un método de preparación de un linfocito T, el linfocito T puede ponerse en contacto con el polinucleótido recombinante *in vivo*, tal como por medio de una pistola génica, por ejemplo. Se conocen métodos adecuados de administración de un vector de la invención a un mamífero para fines de terapia génica (véanse, por ejemplo, Rosenfeld *et al.*, Science 252: 431-434 (1991); Jaffe *et al.*, Clin. Res. 39: 302A (1991); Rosenfeld *et al.*, Clin. Res. 39: 311A (1991); Berkner, BioTechniques 6: 616-629 (1988); Crystal *et al.*, Human Gene Ther. 6: 643-666 (1995); Crystal *et al.*, Human Gene Ther., 6: 667-703 (1995)). Alternativamente, el linfocito T puede ponerse en contacto con el polinucleótido recombinante *in vitro* o *ex vivo*. Tales métodos están dentro de la experiencia del experto en la materia. Los linfocitos T preferiblemente se transforman *ex vivo* mediante el polinucleótido recombinante.

Preferiblemente, las células transformadas expresan eficazmente IL-7 e IL-15. Por ejemplo, PBL transformados expresan IL-7 de manera que tras 3 días *in vitro* los medios de cultivo celular tienen IL-7 a una concentración de al menos 30 pg/ml, más preferiblemente 100 pg/ml, incluso más preferiblemente 500 pg/ml o la función equivalente cuando la citoquina es una variante de IL-7. De manera similar, por ejemplo, los PBL transformados expresan preferiblemente IL-15 de manera que tras 3 días *in vitro* los medios de cultivo celular tienen IL-15 a una concentración de al menos 30 pg/ml, más preferiblemente 100 pg/ml, incluso más preferiblemente 500 pg/ml, o la función equivalente cuando la citoquina es una variante de IL-15. Aunque no hay un nivel de expresión loggable máximo teórico a partir de células transformadas, normalmente no sería necesario una expresión por encima de 50.000 pg/ml para o bien IL-7 o bien IL-15.

Para fines del método dado a conocer de preparación de un linfocito T con supervivencia de células T potenciada, la citoquina, el polinucleótido recombinante, el linfocito T puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento.

ES 2 382 775 T3

La presente descripción proporciona cualquiera de los linfocitos T, o una población de los mismos, que se preparan mediante el método dado a conocer de preparación de un linfocito T con supervivencia celular potenciada.

5 También se proporciona por la presente invención un linfocito T para su uso en un método de tratamiento de un estado médico, por ejemplo, una enfermedad, en un mamífero. El método comprende administrar a un mamífero cualquiera de los linfocitos T descritos en el presente documento, o una población de los mismos, o una composición que comprende cualquiera de los linfocitos T descritos en el presente documento, en una cantidad eficaz para tratar el estado médico en el mamífero.

10 La presente invención proporciona además un linfocito T para su uso en un método de prevención de un estado médico, por ejemplo, una enfermedad, en un mamífero. El método comprende administrar a un mamífero cualquiera de los linfocitos T descritos en el presente documento, o una población de los mismos, o una composición que comprende cualquiera de los linfocitos T descritos en el presente documento, en una cantidad eficaz para prevenir el estado médico en el mamífero.

15 En el tratamiento o la prevención de un estado médico, por ejemplo, una enfermedad, en un mamífero, los linfocitos T que se han transformado, por ejemplo, transducido, con un polinucleótido recombinante que codifica y que expresa una citoquina pueden transferirse al mismo mamífero del que se obtuvieron los linfocitos T. En otras palabras, el linfocito T usado en el presente método de la invención de tratamiento o prevención puede ser un linfocito T autólogo, es decir, puede obtenerse del mamífero en el que se trata o previene el estado médico. Alternativamente, los linfocitos T pueden transferirse a otro mamífero, aunque, en la mayoría de los casos, es preferible que el linfocito T sea autólogo para el mamífero.

20 En el caso de que los linfocitos T sean autólogos para el mamífero, el mamífero puede ser inmunológicamente virgen, puede estar inmunizado, enfermo o en otro estado antes de la recogida de linfocitos T del mamífero. En algunos casos, es preferible que el método comprenda inmunizar el mamífero con un antígeno del estado médico antes de obtener los linfocitos T del mamífero, transducir los linfocitos T obtenidos con el polinucleótido recombinante y administrar el linfocito T o una composición de los mismos. Tal como se comenta en el presente documento, la inmunización del mamífero con el antígeno del estado médico permitirá que la población de linfocitos T que tiene un receptor de células T endógeno reactivo con el antígeno específico del estado médico aumente en número, lo que aumentará la probabilidad de que el linfocito T obtenido para la transducción con el polinucleótido recombinante que codifica la citoquina tenga el receptor de células T endógeno.

25 Según la invención, puede inmunizarse terapéuticamente un mamífero con un estado médico con un antígeno de, o asociado con, ese estado médico, incluyendo inmunización mediante una vacuna. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, la vacuna o el inmunógeno se proporciona para potenciar la respuesta inmunitaria del mamífero al antígeno del estado médico presente en o sobre el agente infeccioso o tejido enfermo. Una inmunización terapéutica de este tipo incluye, pero no se limita a, el uso de proteínas, péptidos o análogos de los mismos de la enfermedad naturales o recombinantes, o péptidos de la enfermedad modificados, o análogos de los mismos que pueden usarse como una vacuna terapéuticamente como parte de la inmunoterapia adoptiva. La vacuna o el inmunógeno puede ser una célula, un lisado celular (por ejemplo, de células transfectadas con un vector de expresión recombinante) un vector de expresión recombinante o una proteína antigénica. Alternativamente, la vacuna, o el inmunógeno, puede ser una proteína, péptido o análogo de los mismos de la enfermedad parcial o sustancialmente purificado o péptidos modificados o análogos de los mismos. Las proteínas o los péptidos pueden conjugarse con lipoproteína o administrarse en forma liposomal o con adyuvante.

30 El presente uso de un linfocito T de la invención en un método de tratamiento o prevención de un estado médico en un mamífero puede comprender etapas adicionales. Por ejemplo, puede realizarse una variedad de procedimientos, tal como se comenta a continuación, sobre los linfocitos T antes de, de manera sustancialmente simultánea con o después de su aislamiento de un mamífero. De manera similar, puede realizarse una variedad de procedimientos sobre los linfocitos T antes de, de manera sustancialmente simultánea con o después de su transformación con un polinucleótido que codifica al menos una citoquina que potencia la supervivencia de los linfocitos T durante la fase de contracción.

35 Según la invención, no se requiere que otras citoquinas deban ponerse en contacto con los linfocitos T o administrarse a un mamífero que recibe los linfocitos T transformados. Sin embargo, se prefiere el uso de otras citoquinas en algunas realizaciones. Otras citoquinas adecuadas incluyen, sin limitación, IL-4, IL-12, IL-21 e IL-23. Estas otras citoquinas actúan también preferiblemente potenciando la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción, lo que puede facilitar la formación y supervivencia de linfocitos T de memoria. Además, también puede tratarse opcionalmente un mamífero al que se administran linfocitos T transformados con citoquinas, antibióticos y otros agentes farmacéuticos adicionales. Una citoquina preferida de este tipo es IL-2, que se administra preferiblemente a dosis bajas. Los linfocitos T transformados pueden transformarse además opcionalmente con ácidos nucleicos para expresar otras citoquinas, otras citoquinas que pueden incluir pero no se limitan a IL-2 a niveles bajos. Estos ácidos nucleicos pueden modificarse mediante ingeniería genética para poner la expresión de las citoquinas adicionales bajo el control de promotores constitutivos, regulables o controlados de manera temporal.

40 En este sentido, la presente invención proporciona un linfocito T para su uso en un método en el que se administra IL-2 al mamífero tras la administración del linfocito T o la composición al mamífero, así como un método en el que no se administra citoquina exógena al mamífero tras la administración del linfocito T o la composición.

El presente método de la invención puede realizarse en mamíferos para los que otros tratamientos del estado médico han fallado o han tenido menos éxito en el tratamiento a través de otros medios. Además, el presente método de la invención puede realizarse conjuntamente con otros tratamientos del estado médico. Por ejemplo, el método puede comprender administrar un régimen contra el cáncer, por ejemplo, quimioterapia no mieloablativa, cirugía, terapia hormonal y/o radiación, antes de la administración del linfocito T o la composición.

Los linfocitos T, que son preferiblemente autólogos para el mamífero transfundido, se estimulan preferiblemente con el antígeno del estado médico, por ejemplo, enfermedad, *in vitro* antes de, simultáneamente con o después de la transformación con el polinucleótido que codifica la citoquina. Los linfocitos T pueden estimularse *in vitro* con el antígeno del estado médico que va a tratarse de cualquier manera adecuada. El antígeno usado para estimular las células *in vitro* es deseablemente el mismo antígeno usado para inmunizar terapéuticamente al mamífero. En este sentido, la presente invención proporciona además un método de tratamiento o prevención tal como se describe en el presente documento, en donde el método comprende inmunizar al mamífero con un antígeno del estado médico antes de la administración del linfocito T o las composiciones.

Los linfocitos T pueden expandirse *in vitro* tras la transformación, por ejemplo, transducción, pero antes de la transferencia o reintroducción, es decir, la administración a un mamífero. Una expansión *in vitro* de este tipo puede aprovecharse de la estimulación con la población de linfocitos mediante activación específica usando uno o más antígenos fuertes preseleccionados. Los linfocitos preseleccionados, transformados pueden cultivarse durante varios días. Entre los días 14 y 21 tras la transformación, las células pueden examinarse opcionalmente para detectar la liberación de citoquinas específicas cuando se exponen a antígenos de la enfermedad, preferiblemente en el contexto de un complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). En este momento, también puede ser deseable reestimar la población de linfocitos con el antígeno fuerte. La reestimulación usando un antígeno fuerte se lleva a cabo preferiblemente a una concentración similar a la usada para la estimulación inicial durante un período de tiempo similar. Si se usan células donadoras alogénicas como antígeno fuerte, la reestimulación se lleva a cabo preferiblemente a una proporción de 0,5:1 a 4:1, más preferiblemente a una proporción de 1:1 a 2:1 (donador:paciente). Estas células pueden reintroducirse directamente en el paciente o pueden congelarse para uso futuro, es decir, para administraciones posteriores a un mamífero.

La expansión específica de antígeno puede complementarse opcionalmente con la expansión en condiciones que estimulan de manera no específica la proliferación de linfocitos tales como, por ejemplo (pero sin limitarse a), con anticuerpo anti-CD3, anticuerpo anti-Tac, PHA o medios que contienen IL-2. Ventajosamente, sin embargo, no se requiere necesariamente estimulación no específica cuando se transducen polinucleótidos recombinantes que expresan IL-7 o IL-15 en los linfocitos T.

Los linfocitos T, o poblaciones de los mismos, de la presente invención, pueden formarse como una composición, tal como una composición farmacéutica que comprende un portador, diluyente y excipiente farmacéuticamente aceptable. En este sentido, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende un linfocito T, o una población de los mismos, que expresa al menos un polinucleótido recombinante que codifica una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de una respuesta inmunitaria, y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la composición comprende linfocitos T transformados con y que expresan el polinucleótido recombinante.

Las composiciones farmacéuticas que contienen los linfocitos T de la presente invención pueden comprender más de un tipo de linfocito T, por ejemplo, pueden comprender linfocitos T que expresan dos citoquinas diferentes que potencian la supervivencia de células T. La composición farmacéutica puede comprender alternativamente un linfocito T particular de la presente invención en combinación con otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, tales como agentes quimioterápicos, por ejemplo, un fármaco contra el cáncer.

El portador puede ser cualquier portador farmacéuticamente adecuado. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de los usados convencionalmente y se basa en consideraciones fisicoquímicas, tales como solubilidad y carencia de reactividad con el/los compuesto(s) activo(s), y por la vía de administración. Un experto en la técnica apreciará que, además de la siguiente composición farmacéutica descrita, los linfocitos T de la presente invención pueden formularse como complejos de inclusión.

Los portadores farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes y diluyentes, son bien conocidos para aquellos expertos en la materia y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que es químicamente inerte para el/los agente(s) activo(s), por ejemplo, el linfocito T, y uno que no tiene efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

La elección del portador se determinará en parte por el linfocito T, así como por el método particular usado para administrar el linfocito T. Por consiguiente, hay una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la presente invención. Las siguientes formulaciones para administración son a modo de ejemplo y de ningún modo son limitativas. Puede usarse más de una vía para administrar el linfocito T y, a veces, una vía particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra vía.

Puede prepararse una composición farmacéutica que comprende linfocitos T transformados de modo que no contiene células vivas distintas de células sanguíneas y linfocitos. Es decir, la composición puede ser estéril excepto por las células T, linfocitos o células sanguíneas transducidas. Tales composiciones pueden prepararse fácilmente mediante selección positiva y/o negativa de las células deseadas a partir de una población de células transformadas con los vectores o polinucleótidos recombinantes de la invención. Las técnicas de selección positiva adecuadas incluyen separaciones por bioafinidad, que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, puede unirse un anticuerpo específico para un antígeno de la superficie celular de un linfocito T a una bola magnética, incubarse con la población transducida, separarse de la misma y opcionalmente lavarse. Otra alternativa es usar anticuerpos similares que se han conjugado de manera fluorescente y clasificar positivamente células con un citómetro de flujo que puede clasificar células activadas por fluorescencia. De manera similar, pueden eliminarse células no deseadas de la composición mediante cualquier técnica adecuada. Las técnicas de selección negativa adecuadas incluyen eliminación inmunomagnética de células no deseadas, y el uso de antibióticos que destruyen microbios. Además, pueden usarse leucoféresis, otras técnicas de filtración, técnica estéril, centrifugación diferencial y otros métodos convencionales para producir una composición adecuada para su administración a un ser humano.

En una realización, pueden administrarse vectores y polinucleótidos recombinantes.

Pueden encontrarse células T en la mayoría de ubicaciones en el organismo de un mamífero. Por consiguiente, puede usarse cualquier vía de administración adecuada. Se prefiere la administración intravenosa de células cuando el mamífero es un ser humano. Una vía particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía. Los expertos en la técnica también conocen bien portadores farmacéuticamente aceptables adecuados, y están fácilmente disponibles. La elección del portador se determinará en parte por el método particular usado para administrar el vector recombinante. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas para su uso en el contexto de la invención.

Formulaciones adecuadas para la administración oral de los ácidos nucleicos y vectores pueden consistir en (a) disoluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del compuesto disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o zumo de naranja; (b) suspensiones en un líquido apropiado; y (c) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes de tamponamiento, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes y excipientes farmacológicamente compatibles.

Las formulaciones preferidas incluyen soluciones de inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. Los ácidos nucleicos y vectores de la invención pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo (pero sin limitarse a), agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones de inyección extemporánea y suspensiones a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles de la clase previamente descrita.

Los ácidos nucleicos, vectores y células de la invención pueden formularse en recipientes sellados de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse congelados. Estos ácidos nucleicos, vectores y células de la invención pueden almacenarse en envases resistentes a la luz, empleando por ejemplo (pero sin limitarse a) viales de vidrio coloreados o cajas de cartón. De manera similar, pueden incluirse con estas composiciones instrucciones para el uso de las composiciones, que preferiblemente cumplen con las regulaciones de la U.S. Food and Drug Administration, y más preferiblemente también con sus equivalentes agencias europea, japonesa y otras. Estos ácidos nucleicos, vectores y células de la invención también están libres preferiblemente de microbios no recombinantes (incluyendo sin limitación hongos y micobacterias) y virus no recombinantes. Preferiblemente, las instrucciones sugieren el uso de una cierta cantidad de una de estas composiciones (o intervalo de cantidades), o sugieren la administración de la composición a un mamífero para investigación o terapia por medio de una vía de administración particular.

Adicionalmente, una célula, y más preferiblemente, un ácido nucleico o vector de la invención puede prepararse en supositorios mezclando con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Pueden presentarse formulaciones adecuadas para la administración vaginal como óvulos, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o fórmulas de pulverizador que contienen, además del principio activo, portadores tales como los que se sabe en la técnica que son apropiados.

La dosis administrada a un animal, particularmente un ser humano, en el contexto de la invención variará con la realización de la invención, la composición empleada, el método de administración y el sitio particular y el organismo que está tratándose. Sin embargo, la dosis debe ser suficiente para proporcionar una respuesta terapéutica.

Puede administrarse cualquier número adecuado de linfocitos T transformados a un mamífero. Aunque un único linfocito T puede expandirse y proporcionar un beneficio, es preferible administrar al menos 10^3 , más preferiblemente al menos 10^5 , incluso más preferiblemente al menos 10^8 y opcionalmente 10^{12} o más linfocitos T transformados. Una realización preferida de la invención comprende la administración de desde aproximadamente 10^8 hasta aproximadamente 10^{12} linfocitos T transformados a un ser humano. No hay un límite superior teórico en el número de linfocitos T transformados que pueden administrarse a un mamífero o el número de veces que pueden administrarse linfocitos

T a un mamífero. El experto habitual apreciará, sin embargo, que las cantidades excesivas de linfocitos T administrados (por ejemplo, en algunas realizaciones más de 10^{15} o 10^{18} células transformadas) pueden exceder la capacidad del mamífero para soportarlas, conducir a secuelas clínicas no deseadas y aumentar innecesariamente los costes. De manera similar, administraciones excesivas de composiciones terapéuticas a mamíferos pueden conducir a efectos no deseados tales como respuestas alérgicas e infección, y de ese modo se evitan preferiblemente.

La invención proporciona además la transferencia o reintroducción de linfocitos T transformados en mamíferos sin la administración de citoquinas exógenas. De manera similar, la invención proporciona la transferencia o reintroducción de linfocitos T transformados en mamíferos que se someten a terapia con IL-2 a dosis baja y/o quimioterapia no mieloablativa conjuntamente con inmunoterapia adoptiva. Tal terapia con IL-2 a dosis baja en seres humanos incluye, por ejemplo, tratamiento con de 20.000 a 200.000 UI/kg por vía intravenosa de una a tres veces al día durante al menos 3 dosis, preferiblemente al menos 9 dosis y hasta un máximo de 45, preferiblemente 30 o más preferiblemente 18 dosis. Un programa de acondicionamiento quimioterápico no mieloablativo adecuado inducirá linfopenia transitoria y puede consistir en, por ejemplo, ciclofosfamida (por ejemplo, 15-80 mg/kg al día durante de 1 a 4 días) seguido por fludarabina (10-50 mg/m² al día durante al menos 1, preferiblemente 2, más preferiblemente al menos 3 días hasta un máximo de 12, preferiblemente 8, más preferiblemente 5 días).

Tal como se usa en el presente documento, el término “mamífero” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos del orden Rodentia, tales como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden Logomorpha, tales como conejos. Se prefiere que los mamíferos sean del orden Carnívora, incluyendo felinos (gatos) y caninos (perros). Se prefiere adicionalmente que los mamíferos sean del orden Artiodactyla, incluyendo bovinos (vacas) y porcinos (cerdos) o del orden Perssodactyla, incluyendo equinos (caballos). Se prefiere adicionalmente que los mamíferos sean del orden Primates, Ceboidea o Simioides (monos) o del orden Antropoidea (seres humanos y simios). Un mamífero especialmente preferido es el ser humano.

Los términos “potenciar”, “tratar” y “prevenir”, así como palabras que provienen de las mismas, tal como se usa en el presente documento, no implican necesariamente prevención, tratamiento o potenciación del 100% o completa. Más bien, hay grados variables de potenciación tratamiento o prevención de los que un experto habitual en la técnica reconoce que tiene un beneficio potencial o efecto terapéutico. En este sentido, los presentes métodos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de potenciación de la supervivencia de células T o cualquier grado de tratamiento o prevención de una enfermedad. En algunos casos, el tratamiento puede abarcar la prevención del estado médico.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplos

Se usaron las siguientes líneas celulares en algunos de los siguientes ejemplos. Las líneas celulares usadas incluyen la línea de rhabdomyosarcoma TE 671 (ATCC HTB-139), la línea epitelial renal altamente transfectable 293T (ATCC CRL-11268), la línea de fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC CRL-1658), la línea celular linfocitoide humana Sup T1 (ATCC CRL-1942), la línea celular linfoblastoide deficiente en TAP T2 (Salter *et al.*, Immunogenetics 21: 235-246 (1985)), la línea de células empaquetadoras del virus de la leucemia del mono gibón PG13 (ATCC CRL-10686), y la línea de células empaquetadoras ecotrópico humanas Phoenix Eco (facilitada amablemente por G. Nolan, Universidad de Stanford, Stanford, CA). El medio de cultivo celular consistió en RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con FCS al 10% (Invitrogen), penicilina 100 U/ml (Invitrogen), estreptomina 100 µg/ml (Invitrogen), L-glutamina 2 mM (Invitrogen), y disolución tampón HEPES 25 mM HEPES (Invitrogen). Las líneas celulares se cultivaron a 37°C en un incubador humidificado de CO₂ al 5%.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra que se han usado polinucleótidos recombinantes con sustitución de la secuencia líder de IL-15 y optimización de codones de IL-15 para expresar el polipéptido IL-15.

En aquellas células que expresan IL-15 endógena, la expresión está estrechamente regulada a muchos niveles. Se han reconocido varias características del gen de IL-15 que podrían contribuir a esta regulación. La región no traducida en 5' del ARNm de IL-15 endógena es muy larga con múltiples codones de iniciación AUG y los polipéptidos de IL-15 endógena tienen péptidos señal de 48 aminoácidos, excepcionalmente largos. Además, el 27% de los codones de IL-15 no son óptimos. Se cree que estos factores contribuyen a la expresión ineficaz de IL-15 y ofrecen oportunidades para mejoras inventivas.

Se clonó un ADNc de IL-15, modificado mediante ingeniería genética para estar situado aguas abajo de la secuencia líder de preprolactina secretada de manera eficaz en lugar del péptido señal de IL-15 largo, en el plásmido pMSGV de manera que el constructo de IL-15 se expresara a partir de las LTR retrovirales del plásmido. Este constructo se denominó pMSGV-PPL-IL-15. Se obtuvo una versión optimizada del codón de la IL-15, “Super IL-15”, y se sustituyó por las secuencias codificantes de IL-15 en pMSGV-PPL-IL-15 para generar el plásmido pMSGV-PPL-Super-IL-15. La secuencia de Super IL-15 aumenta la parte de los codones optimizados desde el 71% de todos los codones hasta

ES 2 382 775 T3

el 95% de todos los codones. Entonces se subclonaron PPL-IL-15 no optimizado, y las secuencias codificantes del codón optimizado, PPL-Super-IL-15, en el vector de expresión eucariota pEF-Neo. Los constructos resultantes, pEF-PPL-IL-15 y pEF-PPL-Super-IL-15, respectivamente, expresaron las secuencias codificantes de IL-15 bajo el control de un promotor del factor-1 α de elongación humano.

Se transfectaron pEF-PPL-IL-15 y pEF-PPL-Super-IL-15 en células 293T usando el reactivo Perfectin y se determinó la producción de IL-15 usando un ELISA directo. Ambos constructos produjeron IL-15 detectable, mientras que una transfección control (GWIZ) produjo IL-15 no detectable (tabla 1). La repetición del experimento por duplicado usando cantidades más óptimas de ADN demostró adicionalmente la producción similar de IL-15 a partir de células 293T transfectadas con o bien pEF-PPL-IL-15 o bien pEF-PPL-Super-IL-15 (tabla 2). Se realizaron ELISA a las 24, 48 y 72 horas tras la transfección.

TABLA 1

Producción de IL-15 por células 293T transfectadas

| Estado | IL-15 (pg/ml) |
|-------------------------------------|---------------|
| 24 h, 1,0 μ g de PPL-IL15 | 1.332 |
| 24 h, 1,0 μ g de PPL-Super-IL15 | 1.351 |
| 24 h, 1,0 μ g de GWIZ | 0 |
| 24 h, 0,5 μ g de PPL-IL15 | 3.854 |
| 24 h, 0,5 μ g de PPL-Super-IL15 | 1.585 |
| 24 h, 0,5 μ g de GWIZ | 0 |
| 48 h, 1,0 μ g de PPL-IL15 | 6.484 |
| 48 h, 1,0 μ g de PPL-Super-IL15 | 7.227 |
| 48 h, 1,0 μ g de GWIZ | 0 |
| 48 h, 0,5 μ g de PPL-IL15 | 12.557 |
| 48 h, 0,5 μ g de PPL-Super-IL15 | 5.462 |
| 48 h, 0,5 μ g de GWIZ | 0 |

TABLA 2

Reproducibilidad de la producción de IL-15 a partir de células 293T transfectadas (transfecciones por duplicado)

| Estado | IL-15 (pg/ml) |
|--------------------------|---------------|
| 24 h-293T/PPL-IL15 | 5.500 |
| 24 h-293T/PPL-IL15 | 5.500 |
| 24 h-293T/PPL-Super-IL15 | 4.600 |
| 24 h-293T/PPL-Super-IL15 | 3.200 |
| 48 h-293T/PPL-IL15 | 23.000 |
| 48 h-293T/PPL-IL15 | 19.000 |
| 48 h-293T/PPL-Super-IL15 | 24.000 |
| 48 h-293T/PPL-Super-IL15 | 26.000 |
| 72 h-293T/PPL-IL15 | 44.000 |
| 72 h-293T/PPL-IL15 | 64.300 |
| 72 h-293T/PPL-Super-IL15 | 55.000 |
| 72 h-293T/PPL-Super-IL15 | 50.000 |

Estos resultados confirmaron la capacidad de los polinucleótidos recombinantes para codificar una citoquina, tal como IL-15 humana, que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria. Además, estos resultados confirman que puede expresarse una citoquina de este tipo tras la transformación de células de mamífero.

ES 2 382 775 T3

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que se han usado polinucleótidos recombinantes con sustitución de la secuencia líder de IL-15 y optimización de codones de IL-15 para expresar el polipéptido IL-15.

Se modificó el plásmido pMSGV-PPL-IL-15 clonando un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) en marco entre la secuencia líder de preprolactina y las secuencias de IL-15 salvaje para generar pMSGV-PPL-IL-15-WPRE. Además, se generó una versión mutada de la secuencia de Super-IL-15, pMSGV-PPL-Super-IL-15 (clon 11). Se transfectaron los plásmidos basados en pMSGV en células 293T usando el reactivo Perfectin y se determinó la producción de IL-15 usando ELISA a las 24 y 48 horas tras la transfección. Las células transfectadas con pMSGV-PPL-Super-IL-15 (clon 11) mutado en IL-15 y MGSIN control o bien no produjeron IL-15 o bien sólo lo produjeron de manera apenas detectable, mientras que las células transfectadas con pMSGV-PPL-IL-15, pMSGV-PPL-IL-15-WPRE, y el constructo de Super-IL-15 no mutado, pMSGV-PPL-Super-IL-15 (clon 15), produjeron cantidades significativas de IL-15.

TABLA 3

Producción de IL-15 a partir de células 293T transfectadas con constructos retrovirales

| Estado | IL-15 (pg/ml) |
|---------------------------------|---------------|
| 24 h, MGSIN | 0 |
| 24 h, MSGV-IL15 | 477 |
| 24 h, MSGV-IL15-WPRE | 35 |
| 24 h, MSGV-Super-IL15 (clon 11) | 0 |
| 24 h, MSGV-Super-IL15 (clon 15) | 475 |
| 48 h, MGSIN | 0 |
| 48 h, MSGV-IL15 | 472 |
| 48 h, MSGV-IL15-WPRE | 205 |
| 48 h, MSGV-Super-IL15 (clon 11) | 3 |
| 48 h, MSGV-Super-IL15 (clon 15) | 467 |

Estos resultados confirmaron la capacidad de los polinucleótidos recombinantes para expresarse a partir de un promotor retroviral para producir IL-15 humana inmunorreactiva. Por tanto, una citoquina, tal como IL-15 humana, que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria puede expresarse a partir de un vector retroviral.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que pueden transformarse células de mamífero con un polinucleótido recombinante para expresar una citoquina, en este caso IL-15, que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria.

Se transfectaron células Phoenix Eco con los vectores retrovirales de IL-15 y comenzaron a producir partículas retrovirales. Se recogió el sobrenadante retroviral y se transfirió a placas recubiertas con RetroNectin. Entonces se transdujeron células PG13 mediante las partículas retrovirales unidas a esas placas. Tras 5 días en cultivo, las células transducidas produjeron IL-15 tal como se determinó mediante ELISA. Entonces se usaron las células PG13 a granel transducidas con o bien pMSGV-PPL-IL-15 o bien pMSGV-PPL-Super IL-15 que se demostró que producían IL-15 para la clonación por dilución límite. Estas células se sembraron en placas de 96 pocillos a diluciones de 3,1, y 0,3 células/pocillo. Tras 10-14 días en cultivo, se seleccionaron los pocillos que contenían clones individuales. Se tomaron muestras de los medios de cultivo celular de la placa de 96 pocillos para la producción de IL-15 mediante ELISA.

El análisis mediante ELISA reveló que 3/54 (5%) de los clones de PG13/IL-15 producidos y 49/61 (80%) de los clones de PG13/Super IL-15 produjeron cantidades detectables de citoquina. Los clones de PG13/Super IL-15 produjeron cantidades considerablemente mayores de IL-15. Se seleccionaron veinticuatro clones para cada vector (IL-15 y Super IL-15) y se hicieron crecer en placas de 24 y luego de 6 pocillos. Una vez que el crecimiento fue confluyente en las placas de 6 pocillos, se recogió el sobrenadante y se congeló y se crioconservaron las células. Luego se sometieron a ensayo varios de los sobrenadantes congelados mediante ELISA y estos resultados se muestran en la tabla 4. Varios clones de células empaquetadoras produjeron cantidades considerables de IL-15.

TABLA 4

Producción de IL-15 mediante clones productores retrovirales

| Transductantes de PG13/MSGV-PPL-IL-15 | | Transductantes de PG13/MSGV-PPL-Super-IL-15 | |
|---------------------------------------|---------------|---|---------------|
| n.º de clon | IL-15 (pg/ml) | n.º de clon | IL-15 (pg/ml) |
| 2 | 0 | 1 | 1.659 |
| 4 | 0 | 2 | 13.079 |
| 5 | 0 | 11 | 7.245 |
| 7 | 1 | 12 | 1.312 |
| 8 | 0 | 15 | 5.624 |
| 9 | 0 | 18 | 2.439 |
| 10 | 1.438 | 19 | 5.973 |
| 11 | 0 | 21 | 3.538 |
| 15 | 1.041 | 23 | 18.746 |
| 17 | 0 | 31 | 1.473 |
| 18 | 0 | 32 | 2.423 |
| 19 | 0 | 36 | 1.820 |
| 23 | 0 | 38 | 14.754 |
| 27 | 0 | 39 | 2.121 |
| 32 | 0 | 47 | 4.640 |
| 48 | 0 | 49 | 5.640 |
| | | 50 | 5.966 |
| | | 52 | 1.087 |
| | | 54 | 3.400 |
| | | 55 | 13.561 |
| | | 56 | 6.345 |
| | | 57 | 5.990 |
| | | 58 | 2.779 |

Por tanto, este ejemplo demuestra que pueden transformarse células de mamífero con un polinucleótido recombinante para expresar una citoquina, en este caso IL-15, que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra que los linfocitos T se han transformado con un polinucleótido recombinante que codifica una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria y expresan esa citoquina. En este ejemplo, se usaron vectores retrovirales para transducir linfocitos T humanos con polinucleótidos recombinantes dando como resultado la expresión de IL-15 humana.

Sup-T1 es una línea celular linfoblástica humana que se puede crecer *in vitro* y es receptiva a la transducción retroviral. Se usaron sobrenadantes de PG13 a granel para transducir células Sup-T1 con sobrenadantes de los vectores MSGV-Super-IL-15, MSGV-IL15 y MSGIN control. Entonces se usó ELISA para someter a ensayo la IL-15 inmunorreactiva. Mientras que los transductantes control no produjeron IL-15 de manera significativa, tanto los transductantes de IL-15 como de Super-IL-15 Sup-T1 producen cantidades significativas de IL-15 (tabla 5). Los transductantes de Super-IL-15 produjeron 10 veces más IL-15 en comparación con las células T transducidas con el polinucleótido PPL-IL-15 no optimizado.

TABLA 5

ELISA de células Sup-T1 transducidas con sobrenadantes virales a granel

| Vector retroviral | IL-15 (pg/ml) |
|------------------------------------|---------------|
| MSGIN | 2 |
| Sobrenadante a granel de MSGV-IL15 | 27 |
| Sobrenadante de MSGV-Super IL15 | 344 |

ES 2 382 775 T3

Además, se analizaron clones individuales de Sup-T1 transducidas. Los sobrenadantes retrovirales, generados con ambos constructos IL-15 y Super-IL-15, que se había demostrado previamente mediante ELISA que producían IL-15, se descongelaron, se diluyeron en serie y se transfirieron a placas de 24 pocillos recubiertas con RetroNectin. Entonces, se transfirieron 5×10^4 células Sup-T1 a cada pocillo de las placas recubiertas de retrovirus tras lavado meticuloso de cada pocillo con PBS. Entonces se sometieron a ensayo los medios de cultivo celular para determinar la producción de IL-15 a los 3 y 6 días tras la transducción. Se seleccionaron varios clones de cada grupo para un examen más preciso. Los clones seleccionados se sacaron de crioconservación y se expandieron. Luego se sembró en placa cada grupo a 4×10^6 células/matraz en un matraz T175. Se hicieron crecer las células hasta casi la confluencia y se recogió el sobrenadante retroviral en dos días consecutivos. Se diluyeron en serie ambos conjuntos de sobrenadantes retrovirales y se aplicaron a placas con RetroNectin y se transdujeron de nuevo las células Sup-T1. En el día 5 del cultivo, se recogió el sobrenadante de Sup-T1 y se sometió a ensayo para determinar la producción de IL-15 mediante ELISA. En cada uno de dos experimentos por duplicado se encontró que 4/clones de Sup-T1 transducidos producían cantidades significativas de IL-15. La transducción de Sup-T1 usando retrovirus de los clones 2 y 38 de PG13/MSGV-Super condujo a la producción superior de IL-15 (por ejemplo, 1.549 pg/y 705 pg/ml a diluciones de 1:1, respectivamente.).

Este ejemplo demuestra que pueden transformarse linfocitos T individuales con un polinucleótido recombinante para expresar una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria, en este caso IL-15, y que luego estos transformantes individuales pueden expandirse *in vitro*.

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra que pueden transformarse linfocitos T con un polinucleótido que codifica una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria y producir citoquina funcional. En este ejemplo se usaron vectores retrovirales para transducir linfocitos T humanos con polinucleótidos recombinantes dando como resultado la expresión de IL-15 humana funcional.

CTLL-2 es un clon de linfocitos T citotóxicos de ratón C57BL/6 usado para someter a ensayo el “factor de crecimiento de linfocitos”. Las células pueden estimularse para proliferar mediante IL-2 o IL-15. Se usó el ensayo de CTLL-2 para determinar si la IL-15 producida por células Sup-T1 transducidas era biológicamente activa.

Se hicieron crecer células CTLL-2 en cultivo durante 4 días y luego se recogieron y se lavaron dos veces en PBS y entonces se sembraron en una placa de 96 pocillos, 5×10^3 células/pocillo. Las células CTLL-2 se incubaron en ausencia de citoquinas durante 4 horas. Entonces se añadieron los sobrenadantes de las células Sup-T1 transducidas al cultivo en diluciones en serie. También se añadieron controles positivos (IL-2 e IL-15) a otros pocillos. Las células CTLL-2 se cultivaron durante un total de 24 horas; durante las seis horas finales, se añadió ^3H -timidina a cada pocillo. Se recogieron las células CTLL-2 en un filtro y se leyeron en un contador β .

Las células CTLL-2 no proliferaron en ausencia de citoquina exógena, mientras que las células CTLL-2 sí proliferaron cuando se añadió IL-2 o IL-15 control a sus medios. Además, los sobrenadantes de las células Sup-T1 transducidas con GFP no estimularon la proliferación de CTLL-2. Sin embargo, la adición de sobrenadantes a partir de células Sup-T1 transducidas con vectores de IL-15, particularmente a partir de los transductantes de Super-IL-15, estimularon la proliferación de CTLL-2 (figura 1). La figura 1 A muestra que las células CTLL-2 usadas no proliferaban en ausencia de citoquina tal como IL-2, pero que eran competentes para proliferar si se exponían a citoquina tal como IL-2. La figura 1B demuestra que las células CTLL-2 usadas respondían a IL-15 recombinante. La figura 1C muestra los resultados de la adición de sobrenadantes de Sup-T1. El sobrenadante de MSGV control no indujo ninguna proliferación. El sobrenadante de MSGV-IL-15 estimuló una proliferación débil pero detectable y el sobrenadante de MSGV-Super-IL-15 estimuló una proliferación fuerte similar a IL-15 recombinante.

Por tanto, este ejemplo demuestra que las células Sup-T1 transducidas de manera retroviral producen IL-15 biológicamente activa. Además, este ejemplo demuestra que el polinucleótido recombinante inventivo que codifica una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria puede transformar linfocitos T para producir citoquina biológicamente activa.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra que los linfocitos de sangre periférica (PBL) pueden ser una fuente de linfocitos T transformados que se transforman con un polinucleótido recombinante para expresar una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria y producir citoquina funcional. Específicamente, este ejemplo demuestra cómo se transdujeron PBL para producir IL-15.

En el día 0, se obtuvieron PBL frescos de sujetos humanos y se activaron con el anticuerpo OKT3. Al día siguiente, se transdujeron las células con vectores retrovirales en placas recubiertas con RetroNectin. Se repitió la transducción en el día 3. En el día 7, se suspendieron las células en medio fresco y se sembraron en una placa de 24 pocillos a $1,5 \times 10^6$ células/pocillo. Tras esto, en el día 9, se eliminó el medio de cultivo y se sometió a ensayo para determinar la producción de IL-15 mediante ELISA. Los resultados de este ensayo, presentados en la tabla 6, indicaron que los PBL se habían transducido con el vector Super IL-15 y producían niveles medibles de IL-15.

ES 2 382 775 T3

TABLA 6

Producción de IL-15 por PBL transducidos/estimados por OKT3

| Grupo | IL-15 (pg/ml) |
|------------------------------------|---------------|
| 24h, PBL/MSGIN | 0 |
| 24h, PBL/MSGV-Super-IL-15, clon 2 | 39 |
| 24h, PBL/MSGV-Super-IL-15, clon 38 | 34 |
| 48h, PBL/MSGIN | 0 |
| 48h, PBL/MSGV-Super-L-15, clon 2 | 67 |
| 48h, PBL/MSGV-Super-IL-15, clon 38 | 61 |

Por tanto, los PBL transducidos con el vector Super IL-15 producen niveles medibles de IL-15.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra que los linfocitos de sangre periférica (PBL) pueden ser una fuente de linfocitos T transformados con un polinucleótido recombinante para expresar una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria y producir citoquina funcional. Específicamente, este ejemplo demuestra que los PBL se transducían con o bien IL-7 o bien IL-15. Además, las células transducidas habían potenciado la supervivencia *in vitro* y habían mantenido su reactividad con antígenos tumorales.

Las células T no producen de manera natural ni IL-7 ni IL-15. Por consiguiente, se obtuvieron mediante ingeniería genética vectores retrovirales que podían expresar IL-2, IL-7 e IL-15. Para producir un vector que pudiera producir cantidades suficientes de IL-15, se realizaron varios cambios en el casete de expresión de IL-15. En primer lugar, se sustituyó la secuencia líder de la IL-15 natural con la secuencia líder procesada más fácilmente del gen de preprolactina. A continuación, se optimizó el codón de iniciación de la traducción según la secuencia consenso de Kozak, y finalmente se optimizó la secuencia codificante de la proteína tanto para sustituir los codones raros con otros más abundantes, mientras que al mismo tiempo se optimizaba el plegamiento del ARN para minimizar la energía libre y facilitar la unión a ribosomas. Este nuevo vector de expresión de IL-15, Super-IL-15, produce más proteína IL-15 de manera significativa que los vectores notificados anteriormente (véanse los ejemplos anteriores).

Se transdujeron CMSP de pacientes previamente vacunados con péptidos gp100 para someter a prueba los tres vectores de expresión de citoquina en una comparación en paralelo. Se pulsaron las células *in vitro* con péptido gp100 seguido al día siguiente por la adición de IL-2 y luego se expusieron a los vectores de citoquina en los días 3 y 4. Entonces se sometieron a ensayo las células 6-7 días tras la traducción para determinar la producción de citoquina tras cultivarse en ausencia de ninguna citoquina añadida. Los PBL transducidos produjeron las citoquinas para cuya expresión se habían modificado por ingeniería genética. La tabla 7 muestra la producción de citoquina por los PBL transducidos con vector tal como se mide mediante ELISA ("UT" es control no traducido). Se cultivaron las células en presencia o ausencia de OKT3 para estimular la activación de las células T y se añadió anticuerpo anti-Tac a algunos cultivos para bloquear la captación de IL-2 secretada. Todos los valores se determinaron tras 3 días de cultivo en ausencia de citoquinas añadidas, excepto los "medios de inicio" que representan medios desde el comienzo de la retirada de IL-2.

Entonces se cultivaron los PBL transducidos en medio que carecía de IL-2 (figura 2). Los cultivos transducidos con vector control ("MSGIN") y de manera simulada ("UT") perdieron rápidamente la viabilidad en el plazo de las primeras dos semanas tras la retirada de IL-2. Las células modificadas por ingeniería genética para producir las diferentes citoquinas se expandieron tras la retirada de la citoquina y continuaron sobreviviendo durante hasta cuatro semanas tras la retirada de citoquina con una supervivencia tardía superior de las poblaciones de células modificadas por ingeniería genética para IL-7 e IL-15 que para las células modificadas por ingeniería genética para IL-2.

TABLA 7

Expresión de citoquina por células transducidas

| Añadido a los medios | Añadido a los medios | IL-2 (pg/ml) | IL-2 (pg/ml) | IL-15 (pg/ml) | IL-15 (pg/ml) | IL-7 (pg/ml) | IL-7 (pg/ml) |
|----------------------|----------------------|--------------|------------------|---------------|-------------------|--------------|------------------|
| | | UT | IL-2 Transducida | UT | IL-15 Transducida | UT | IL-7 Transducida |
| Sin OKT3 | Sin Ac | 0,0 | 122,3 | 0,0 | 239,9 | 11,8 | 4069,9 |

ES 2 382 775 T3

| | | | | | | | |
|----------|-----------------|-------|--------|------|--------|-----|---------|
| Sin OKT3 | IgG2a | 0,0 | 188,4 | 25,5 | 232,3 | 6,8 | 3360,2 |
| Sin OKT3 | Anti-Tac | 0,5 | 191,7 | 0,0 | 246,3 | 6,7 | 3474,0 |
| Sin OKT3 | Medio de inicio | 0,0 | 2,7 | 0,0 | 0,0 | 7,2 | 141,6 |
| + OKT3 | Sin Ac | 1,6 | 5103,0 | 0,0 | 1617,0 | 7,6 | 16557,0 |
| + OKT3 | IgG2a | 108,2 | 5999,0 | 0,0 | 2054,0 | 6,9 | 16467,0 |
| + OKT3 | Anti-Tac | 116,5 | 7073,0 | 0,0 | 2146,0 | 6,7 | 14480,0 |
| + OKT3 | Medio de inicio | 0,0 | 252,0 | 0,0 | 36,0 | 7,8 | 152 |

Para determinar si las células modificadas por ingeniería genética conservan su capacidad para reconocer las células de melanoma o la proteína gp100, las células se co-cultivaron con células T2 pulsadas con péptido gp100 o líneas celulares de melanoma que expresan gp100. Se midió la producción por parte de los linfocitos T del interferón gamma mediante ELISA para determinar la reactividad. La figura 3 demuestra que las líneas de células de melanoma que expresan gp100/HLA-A2 eran reconocidas por las células transducidas. Las líneas de células de melanoma 526, 624, 888 y 938 expresan todas gp100, pero sólo 526 y 624 expresan HLA-A2. En la figura 3, IL-2, IL-7 e IL-15 son linfocitos T transducidos con citoquinas, L2D8 es un clon de linfocitos T citotóxicos anti-gp100, TCR es un transfectante control, y NV es un control no transducido.

La figura 4 demuestra que todas las poblaciones de células transformadas con polinucleótido de citoquina recombinante conservaban la capacidad para reaccionar con células T2 pulsadas con proteínas gp100. Esta reactividad se midió mediante la producción de interferón gamma en respuesta a antígenos. La figura 4 revela además que los PBL transducidos con citoquina (IL-2, IL-7 e IL-15) producían más interferón cuando las células T2 se pulsaban con concentraciones menores de antígeno gp100 (10 ng/ml, 1 ng/ml) que los PBL control (TCR, vector control; NV, sin virus control).

Por tanto, este ejemplo demuestra la transducción satisfactoria de los PBL con o bien IL-7 o bien IL-15 y que las células transducidas con citoquina tenían potenciada la supervivencia *in vitro* y mantenían (e incluso aumentaban) su reactividad con antígenos tumorales.

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra la "expansión REP" de TIL transformadas con citoquina a cantidades terapéuticas.

Se expanden TIL transformadas con citoquina usando un único protocolo de expansión rápida (REP), luego se vuelven a someter a prueba para determinar su actividad y especificidad según el protocolo, tal como se describió anteriormente en el ejemplo 7. Ocho días antes de la recogida de células y la infusión de nuevo, se retira una alícuota de células para su recuento y para someter de nuevo a ensayo. Las células se someten a ensayo para determinar la especificidad de péptido y el reconocimiento tumoral mediante el ensayo de co-incubación y ELISA tal como se describió anteriormente. Si la densidad celular es mayor de 1×10^6 /ml, las células se dividen en matraces adicionales o se transfieren a bolsas de cultivo Baxter de 3 litros. Entonces se añade IL-2 hasta 1.000 CU/ml, se añade Fungizone hasta 1,25 μ g/ml y se añade Cipro hasta 5-10 μ g/ml. En el día 11, se añade IL-2 a matraces de REP hasta 1.000 CU/ml. Los cultivos celulares se dividen según sea necesario.

En el día 14, se recogieron las células y o bien se prepararon para ciclos de REP adicionales o bien se crioconservaron. Si las células han crecido hasta números suficientes para el tratamiento del paciente, se recoge una muestra de cada matraz para las pruebas de microbiología 2-3 días antes del comienzo de la terapia con TIL (las pruebas duran 2 días). Se añade de nuevo IL-2 a 1.000 CU/ml en el día 14 y cada 3 días hasta que se prepara el producto final para la infusión.

En el día 12-20, se prepara el producto final para la infusión del paciente. El contenido (células y medios) de los matraces se transfiere a tubos de centrifuga de 250 ml, mientras que se recogen las células en bolsas de cultivo Baxter usando un sistema de recogida de células centrífugo continuo Baxter/Fenwal. Se toman alícuotas de las bolsas representativas y se reúnen para una prueba de Gram. Se centrifugan las células hasta que sedimentan (1.000 rpm, 15 min., aproximadamente 25°C) y se combinan en un único tubo, luego se lavan mediante resuspensión en cloruro de sodio al 0,9% (p/v), seguido por centrifugación, y finalmente se resuspenden en 45-400 ml de cloruro de sodio al 0,9%. Se añade albúmina humana (25% p/v) hasta una concentración final del 2,5% (p/v). Se retiran alícuotas para el recuento celular y las pruebas de viabilidad mediante exclusión de azul tripano, y para las pruebas de control de calidad. Se infunde el producto final por vía intravenosa lo antes posible.

Este ejemplo demuestra cómo pueden prepararse TIL y transferirse a un paciente tras la transformación con un polinucleótido recombinante que codifica una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria.

ES 2 382 775 T3

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra la generación de vectores de IL-15 salvaje y con codones optimizados.

5 Se llevó a cabo la construcción de plásmidos de vector retroviral tal como sigue: se usó el vector retroviral pMSGV1, que contiene una LTR de virus de células madre murinas y señales de procesamiento de ARN similares a la clase MFG de vectores retrovirales, como estructura principal de vector. La construcción detallada de este vector se describió recientemente (Hughes *et al.*, Hum Gene Ther 16: 457-472 (2005)).

10 Se construyeron dos plásmidos de vector retroviral que codifican la IL-15 humana. pMSGV1 PPL IL-15, que porta la secuencia de IL-15 nativa unida a la secuencia líder de preprolactina bovina (PPL IL-15), se ensambló mediante la inserción de un fragmento de NeoI/BamHI de un constructo de expresión de IL-15 (facilitado amablemente por Y. Tagaya, National Institutes of Health, Bethesda, MD) (Marks-Konczalik *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 97: 11445-11450 (2000)) en los sitios NeoI/SnaBI de pMSGV1. Se sintetizó un gen de IL-15 con codones optimizados en el que se realizaron 63 sustituciones de codones en la región de la proteína madura de la secuencia de PPL IL-15 (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA). Estos cambios en la secuencia codificante minimizaron el uso de codones raros mientras que mantenían una energía libre baja tal como se calculó mediante el paquete Vienna RNA (Hofacker, Nucleic Acids Res 31: 3429-3431 (2003)). Entonces se subclonó este gen sintético y se insertó en los sitios NeoI/SnaBI de pMSGV1 para dar pMSGV1 PPL CO IL-15.

20 Se usó el vector retroviral del receptor de células T anti-MART-1, denominado AIB, para las transducciones control. Este vector también utiliza la estructura principal del vector retroviral pMSGV1 (Hughes *et al.*, Hum Gene Ther 16: 457-472 (2005)).

25 La redundancia del código genético no se refleja en una distribución homogénea de los ARNt para ciertos aminoácidos, lo que conduce a la posibilidad de “codones raros” en cualquier cistron dado. El análisis de la secuencia de ADN de la proteína IL-15 madura reveló que 29 de los 114 codones (25%) se utilizaban con una frecuencia <20% en genes humanos. En comparación, el gen de IL-2 contiene 20 codones raros en una secuencia codificante del total de 133 codones (15%). Se diseñó una secuencia codificante de IL-15 alternativa teniendo en cuenta: 1) la frecuencia de codón y 2) la minimalización del plegamiento de ácidos nucleicos, tal como se pronostica a través de cálculos de energía libre. La secuencia de ácido nucleico final del gen sintético de IL-15 incluye un total de 63 sustituciones de codón. 19 de estos codones alternativos sustituyen a los codones nativos con frecuencias de utilización inferiores al 20%. La secuencia de aminoácidos del gen optimizado de IL-15 se mantiene idéntica a la secuencia salvaje (figura 5). El transcrito de ARN salvaje tiene una energía libre pronosticada de 76 kcal/mol; la molécula con codones optimizados tiene una energía libre pronosticada de 38 kcal/mol. Este gen sintético se subclonó en el vector retroviral de IL-15 salvaje, sustituyendo a la secuencia de la proteína madura salvaje mientras que dejaba intacta la secuencia líder de la preprolactina bovina.

40 Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra que los vectores retrovirales de IL-15 con codones optimizados salvaje tienen expresión comparable en líneas celulares transfectadas.

45 Se sometió a prueba la actividad de los vectores pMSGV1 PPL IL-15 y pMSGV1 PPL CO IL-15 transfectando las líneas celulares NIH/ 3T3, TE671 y 293T por triplicado con diluciones en serie de ADN de plásmido de vector retroviral. Se llevó a cabo la transducción retroviral tal como sigue: Se recubrieron placas de 24 pocillos no tratadas para cultivo tisular (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) con 25 mg/ml de fragmentos de fibronectina recombinante (RetroNectin, Takara, Otsu, Japón). Se añadieron sobrenadantes de vector retroviral y se incubaron las placas a 32°C durante 2-4 h seguido por almacenamiento a 4°C durante la noche. Se atemperaron las placas hasta temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se añadieron $0,1-1,0 \times 10^6$ células a cada pocillo con 1 ml de medio de cultivo tisular por pocillo. Entonces se incubaron las placas durante la noche en un incubador humidificado de CO₂ al 5% a 37°C. Se evaluó la producción de citoquina de cada línea celular mediante ELISA.

55 En todas las condiciones sometidas a prueba y en cada línea celular, se produjo IL-15 a niveles similares por las células que recibían o bien ADN de vector con codones optimizados o bien nativo (figuras 6-8).

Ejemplo 11

60 Este ejemplo demuestra que la optimización de codones no influye en la producción de retrovirus por las líneas celulares empaquetadoras.

65 Para evaluar si la optimización de codones influye en la producción de retrovirus por las líneas celulares empaquetadoras, se transfectaron células empaquetadoras Phoenix Eco con pMSGV1 PPL IL-15 y pMSGV1 PPL COIL-15. Se sembraron en placa 5×10^5 células empaquetadoras Phoenix Eco en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos. Al día siguiente, se transfectaron las células con 2 µg de ADN de plásmido de o bien pMSGV1 PPL IL-15 o bien pMSGV1 PPL CO IL-15 usando el reactivo GenePorter2 (Gene Therapy Systems, San Diego, CA). 24

ES 2 382 775 T3

h después, se aspiraron los medios y se sustituyeron por 2 ml de medio fresco/pocillo. 48 h tras la transfección, se recogió el sobrenadante del cultivo celular que contenía retrovirus. Se realizaron transfecciones por triplicado para cada plásmido, por lo que se produjeron 3 preparaciones de retrovirus separadas de cada plásmido.

5 Se llevó a cabo la generación de clones de células empaquetadoras de alto título tal como sigue: Se transfectaron las células empaquetadoras Phoenix Eco con pMSGV1 PPL IL-15 o pMSGV1 PPL CO IL-15 usando el reactivo GenePorter2. Se recogió el sobrenadante retroviral 48 h tras la transfección y se transfirió a placas que no eran de cultivo tisular recubiertas con fibronectina recombinante (Takara). Entonces se transdujeron células PG13 en estas
10 placas. Se aislaron los clones mediante cultivo por dilución límite y se seleccionaron para determinar la producción de IL-15 mediante ELISA (R&D Systems). Entonces se aplicaron los sobrenadantes retrovirales producidos por estos clones a placas recubiertas con RetroNectin (Takara) y se usaron para transducir células Sup T1. Se seleccionó un clon de alto título producido a partir de pMSGV1 PPL CO IL-15 en base a la producción de IL-15 por las células Sup T1 transducidas. Entonces se extrajo el ADN genómico del clon de PG13 seleccionado y se realizó transferencia de tipo
15 Southern con el fin de verificar la integridad del vector y de evaluar el número de integraciones. Este clon se usó para producir retrovirus para todos los experimentos posteriores en los que se transdujeron linfocitos humanos.

Se tituló el retrovirus resultante mediante análisis de transferencia puntual de tipo Northern (Onodera *et al.*, Hum Gene Ther 8: 1189-1194 (1997)) usando una sonda común a ambos vectores. Los sobrenadantes retrovirales de las células Phoenix Eco transducidas con vector salvaje o con codones optimizados contenían cantidades comparables de
20 ARN (datos no mostrados).

Ejemplo 12

25 Este ejemplo demuestra la expresión de IL-15 potenciada en células transducidas con el vector retroviral con codones optimizados.

Se usaron las preparaciones de vector retroviral descritas en el ejemplo anterior para transducir células NIH/3T3. Se usaron sobrenadantes retrovirales para transducir células NIH/3T3 para evaluar la producción de IL-15 por células
30 diana. Se aplicaron 400 μ l de sobrenadantes retrovirales no diluidos y diluidos en serie a placas de 24 pocillos que no eran de cultivo tisular recubiertas con fibronectina recombinante, tal como se describió anteriormente. Entonces se transdujeron 1×10^5 células NIH/3T3 en cada pocillo de las placas recubiertas con retrovirus. 24 h tras la transducción, se lavaron los pocillos tres veces con 2 ml de PBS (Biofluids, Rockville, MD) y luego se llenaron con 2 ml de medio fresco. Se recogió el medio de cultivo celular a las 72 h tras la transducción y se analizó el contenido en IL-15 mediante
35 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Veinticuatro horas tras la transducción, se lavaron las placas para eliminar cualquier rastro de IL-15 que pudiera transferirse del sobrenadante retroviral. Cuarenta y ocho horas más tarde, se recogieron los medios de cultivo celular y se sometieron a ensayo para determinar la IL-15 (figura 9). Las células transducidas con un retrovirus que codifica
40 GFP no produjeron niveles detectables de IL-15 (datos no mostrados). Los medios de cultivo celular de las células NIH/3T3 transducidas con diluciones en serie 2 veces de retrovirus con pMSGV1 PPL IL-15 contenían 436, 205, 98 y 44 pg/ml de IL-15. Por el contrario, los medios de cultivo celular de las células NIH/3T3 transducidas con diluciones similares de retrovirus con pMSGV1 PPL CO IL-15 contenían 1051, 498, 248 y 135 pg/ml de IL-15, un aumento de aproximadamente 2,5 veces en la producción de IL-15.

45 Con el fin de descartar diferencias en las eficacias de transducción de los vectores retrovirales de IL-15 salvaje y con codones optimizados, se aisló el ADN genómico y se analizó para determinar las secuencias del vector. Usando cebadores de oligonucleótidos idénticos, se realizó la PCR y se normalizó la amplificación específica de vector con respecto a β -actina co-amplificada. La amplificación por PCR utilizó ADN genómico extraído de lisados celulares
50 usando la disolución QuickExtract (Epicentre, Madison, WI). Se sintetizaron cebadores de oligonucleótidos que flanqueaban el sitio de clonación múltiple de la estructura principal del vector retroviral pMSGV1: ggggtggaccatcctctaga (SEQ ID NO: 7) + accgtcgactgcagaattcg (SEQ ID NO: 8). También se emplearon cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de β -actina. Se realizó la PCR durante 30 ciclos a 96°C durante 30 s, a 60°C durante 30 s y a 72°C durante 90 s en un termociclador PTC-200 (Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN). Se corrieron los
55 productos de la PCR en un gel de agarosa al 1% y posteriormente se obtuvieron imágenes y se cuantificaron con un sistema analizador de imágenes luminiscentes LAS-1000 (Fujifilm Medical Systems USA). Se calculó la razón de la intensidad de la banda de inserción del vector en comparación con la banda de β -actina correspondiente para cada una de las muestras de lisado celular.

60 Tal como se muestra en las figuras 10 y 11, la transducción con o bien el retrovirus salvaje o bien con codones optimizados condujo a eficacias comparables en la transferencia de genes.

Ejemplo 13

65 Este ejemplo demuestra que la transducción del vector de IL-15 de PBL humanos da como resultado la producción de citoquina dependiente de estimulación y la persistencia de las células en ausencia de soporte de citoquina exógena.

ES 2 382 775 T3

Se llevaron a cabo estudios de transducción de PBL y retirada de citoquina tal como sigue: Se obtuvieron PBL mediante leucoféresis de pacientes con historia de melanoma que se trataron con un protocolo de vacuna con péptido adyuvante en el Instituto Nacional del Cáncer. Se purificaron los linfocitos mediante centrifugación en un colchón de Ficoll/Hypaque, se lavaron en HBSS y se cultivaron en medio que consistía en medio AIM-V (Invitrogen) complementado con IL-2 300 U/ml, suero AB humano al 5% (Valley Biomedical, Winchester, Virginia), penicilina 100 U/ml (Invitrogen), estreptomycin 100 µg/ml (Invitrogen), L-glutamina 2 mM (Invitrogen), 2-mercaptoetanol 55 µM y disolución tampón HEPES 25 mM (Invitrogen). Se generaron linfocitos activados de manera policlonal añadiendo 50 ng/ml de OKT3 en el día 0 de cultivo. Se generaron linfocitos reactivos con péptidos a partir de PBL obtenidos de pacientes vacunados previamente con el péptido gp100:209-217 (210 M) modificado en el residuo de anclaje (20); estos PBL se activaron añadiendo 1 µg/ml de gp100:209-217 (210 M) al medio de cultivo de linfocitos, en ausencia de IL-2, en el día 0. En el día 1, se añadieron 300 U/ml de IL-2 a las células. Los linfocitos se cultivaron a 37°C en un incubador humidificado de CO₂ al 5%. Las células activadas por OKT3 se transdujeron en los días de cultivo 2 y 3, mientras que las células estimuladas por péptido se transdujeron entre los días de cultivo 5 y 7. Se expuso cada cultivo a retrovirus un total de dos veces, en días sucesivos, transfiriendo 0,5-1,0 x 10⁶ células en un volumen de 1 ml de medio a cada pocillo de una placa de 24 pocillos que no era de cultivo tisular que se había recubierto secuencialmente con RetroNectin (Takara) y luego con retrovirus.

Se emprendieron estudios que requieren retirar de las células la IL-2 exógena recogiendo y lavando los linfocitos tres veces en un medio de cultivo de linfocitos sin IL-2. Tras el lavado final, se sometieron a prueba los medios mediante ELISA para IL-2 y/o IL-15 (Endogen, Cambridge, MA, y R&D Systems, respectivamente) para verificar que no había presente citoquina residual. Entonces se resuspendieron las células en medio de cultivo de linfocitos sin IL-2 a una concentración de 1 x 10⁶ células/ml y se devolvieron a los recipientes de cultivo tisular. Se enumeraron las células y se evaluaron para determinar la viabilidad mediante exclusión con azul de tripano cada 3-7 días. Se renovaron los medios cada 3-7 días eliminando la mitad de los medios consumidos y sustituyendo el volumen con medio de cultivo de linfocitos sin IL-2.

Se generaron clones de células empaquetadoras retroviral PG13 que portaban el gen de IL-15 usando pMSGV1 PPL CO IL-15. Se seleccionó un clon de células productor de alto título partiendo de la base de su capacidad para transducir células Sup T1 para que expresen IL-15. Una transferencia de tipo Southern verificó la integridad del vector y demostró 4 sitios de integración del vector (datos no mostrados). Se usó esta célula empaquetadora de vector retroviral de IL-15 con codones optimizados para producir el retrovirus en todos los estudios posteriores que implicaban linfocitos humanos transducidos con IL-15. Las eficacias de transducción fueron del 50-70% tras dos transducciones secuenciales, tal como se evaluó a través de PCR semi-cuantitativa y PCR en tiempo real (datos no mostrados).

Se llevó a cabo un ensayo de producción de IL-15 en linfocitos tal como sigue: Se lavaron linfocitos control o transducidos con IL-15 tres veces en medio de cultivo. Entonces se resuspendieron 2 x 10⁵ linfocitos en medio de cultivo celular sin IL-2 y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se recubrieron previamente la mitad de los pocillos con anticuerpo OKT3 (200 µg/pocillo). Tras 3 días en cultivo, se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular para su análisis mediante ELISA (R&D Systems).

Se transdujeron PBL estimulados por OKT3 de 5 pacientes con el vector de IL-15. La producción de citoquina a partir de estas células osciló entre 251 y 2095 pg/ml (las células no transducidas no produjeron cantidades detectables de IL-15). La estimulación de las células con OKT3 unida a la placa dio como resultado un aumento de 2 a 5 veces en la producción de citoquina; se produjeron entre 1186 y 3957 pg/ml de IL-15 tras la estimulación (figura 12). La activación dependiente de estimulación de las LTR retrovirales está bien descrita (Plavec *et al.*, Gene Ther 4: 128-139 (1997); Auten *et al.*, Hum Gene Ther 10: 1389-1399 (1999); Parkman *et al.*, Annu Rev Med 51: 33-47 (2000)) y se había notificado previamente en linfocitos transducidos de manera retroviral con IL-2 (Liu *et al.*, J Immunother 26: 190-201 (2003)).

Tras 7 días en cultivo y 4 días tras la transducción final, se lavaron los linfocitos meticulosamente para eliminar cualquier rastro de citoquinas solubles y se devolvieron al cultivo en ausencia de citoquina exógena. Los linfocitos no transducidos disminuyeron rápidamente tanto en la viabilidad como en los recuentos celulares. Hacia el día 30 tras la retirada de citoquina, no pudieron detectarse células no transducidas. Por el contrario, persistían de manera uniforme linfocitos transducidos con IL-15 *in vitro* durante más de 60 días (figura 13). Tras 60 días, 2 de 5 cultivos transducidos con vectores de IL-15 disminuyeron significativamente en viabilidad, mientras que los 3 cultivos restantes persistieron más de 80 días en ausencia de citoquina añadida. En un experimento similar, llevado a cabo durante un transcurso de tiempo más largo, las células transducidas con IL-15 persistieron *in vitro* durante 181 días, mientras que los linfocitos no transducidos y los linfocitos transducidos con un gen control fueron indetectables tras cultivo durante 30 días en ausencia de citoquina exógena (figura 14).

Durante el transcurso de estos estudios, se transdujeron los linfocitos de 17 pacientes con el vector de IL-15. De manera sistemática, los cultivos de linfocitos transducidos con IL-15 demostraron persistencia prolongada *in vitro* tras la retirada de la IL-2 en comparación con los cultivos control. En 16 de 17 cultivos, se detectaron linfocitos transducidos con IL-15 viables desde los 40-181 días tras la retirada de citoquina. Sin embargo, uno de los 17 cultivos transducidos con IL-15 mostró expansión clonal logarítmica durante más de 365 días (datos no mostrados); esta línea celular está en investigación activa.

ES 2 382 775 T3

Ejemplo 14

Este ejemplo demuestra que las células T humanas activadas expresan IL-15R α .

5 Los ratones deficientes en IL-5 e IL-15R α manifiestan fenotipos similares, mostrando números disminuidos de células CD8⁺ y una carencia casi total de células CD8 de memoria, lo que sugiere que la IL-15R α de alta afinidad es crítica para la función de IL-15 *in vivo* (Kovanen *et al.*, Immunol Rev 202: 67-83 (2004)). *In vitro*, los niveles suprafisiológicos de citoquina pueden acoplar receptores de IL-15 de afinidad intermedia y baja en linfocitos que carecen de IL-15R α . Para determinar si se expresaba IL-15R α en células T activadas por OKT3, se evaluaron linfocitos
10 transducidos con IL-15, así como células control no transducidas, crecidos en medios que contenían o bien IL-2 o bien IL-15 (figura 15). Se detectó IL-15R α con un anticuerpo policlonal, biotinilado y un anticuerpo control de isotipo coincidente biotinilado; entonces se marcó el anticuerpo unido a la superficie celular con estreptavidina-PE (R&D Systems). Se detectó PE a través de citometría de flujo.

15 Linfocitos no transducidos, estimulados con OKT3 e IL-2 en el día 0 de cultivo, expresaban IL-15R α en los subconjuntos tanto CD4⁺ como CD8⁺ (positivos al 86% y el 69% en comparación con el control de isotipo, respectivamente). Linfocitos no transducidos estimulados con OKT3 y crecidos en medios que contenían 100 ng/ml de IL-15 no manifestaron tinción de IL-15R α , ni linfocitos transducidos con vector de IL-15. Por tanto, IL-15 exógena o endógena parecía reprimir la expresión de IL-15R α .
20

Ejemplo 15

Este ejemplo demuestra el fenotipo de linfocitos transducidos con IL-15.

25 Los subconjuntos de linfocitos T se definen a menudo por la expresión en la superficie celular de moléculas coestimuladoras, moléculas de adhesión y receptores; estas proteínas de la superficie celular, a su vez, se ven sometidas a influencias tales como estimulación de TCR y acoplamiento de citoquinas. Con el fin de definir adicionalmente la influencia de la transducción de IL-15 sobre linfocitos T, se evaluaron cultivos a largo plazo de linfocitos transducidos
30 con IL-15 crecidos en ausencia de citoquina exógena, así como linfocitos no transducidos crecidos en medios que contienen o bien IL-2 o bien IL-15. Se midió la expresión en la superficie celular de CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L y CCR7 usando anticuerpos conjugados con FITC, PE o APC y los controles de isotipo correspondientes (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se detectaron FITC, PE o APC usando citometría de flujo.

35 Linfocitos transducidos con IL-15 demostraron aumentos modestos en la tinción para CD27, CD28 y CD62L con respecto a linfocitos no transducidos cultivados en IL-2 o IL-15 (figura 16). Esto se vio reflejado tanto en el porcentaje de células que presentaban tinción positiva en comparación con los controles de isotipo como en la intensidad de fluorescencia media. No se observaron diferencias en la expresión de CD45RA, CD45RO ni CCR7 (datos no mostrados).
40

Ejemplo 16

Este ejemplo demuestra que PBL estimulados con OKT3 transducidos con IL-15 continúan proliferando en ausencia de soporte de citoquina exógena y resisten la apoptosis inducida por la retirada de citoquinas.

45 Cuando se transdujeron PBL estimulados con OKT3 con el gen de IL-15 gene, siguieron siendo viables durante períodos prolongados en cultivo, pero dejaron de aumentar en número de células. Se analizó el mecanismo de esta persistencia evaluando en primer lugar la incorporación de timidina. Se llevó a cabo el ensayo de proliferación de linfocitos tal como sigue: se lavaron los linfocitos tres veces con medio de cultivo y se sembraron a 1×10^5 células/pocillo en una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo, en presencia o ausencia de 300 UI/ml de IL-2. Se cultivaron las células durante un total de cuatro días y, en las 16 horas finales de cultivo, se añadió a cada pocillo 1 μ Ci/pocillo de [metil-³H]-timidina (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). Se recogió el ADN celular y se contó mediante recuento de centelleo líquido.
50

55 En el día de cultivo 7, se lavaron linfocitos no transducidos, transducidos con vector control y transducidos con IL-15 para eliminar la IL-2, entonces se cultivaron en presencia o ausencia de IL-2 durante 4 días. Se añadió ³H-timidina durante las 16 horas finales de cultivo. La evaluación de la incorporación de timidina reveló que las células transducidas con IL-15 continuaban proliferando en ausencia de citoquina exógena, mientras que las células no transducidas o transducidas control no (figura 17).
60

Se evaluó a continuación si las células transducidas con IL-15 estaban protegidas de la muerte apoptótica tras la retirada de IL-2. Se retiró secuencialmente la IL-2 de fracciones de cultivos de PBL no transducidos, transducidos con vector control y transducidos con IL-15 durante 3 días consecutivos, comenzando en el día de cultivo 7. Cuatro días más tarde, se tiñeron las células para 7-AAD/anexina V y se analizaron mediante citometría de flujo (figura 18).
65 Se realizó la tinción de anexina V y 7-AAD para la detección de células apoptóticas usando el kit de apoptosis I de anexina V-PE (BD Pharmingen). Se midió la inmunofluorescencia usando un citómetro de flujo FACScan y se analizó usando el software CellQuest Pro (Becton Dickinson).

ES 2 382 775 T3

Poblaciones de células transducidas con gen control y no transducidas demostraron un aumento en las células apoptóticas en el plazo de 24 horas tras la retirada de citoquinas; el porcentaje de células que experimentaban apoptosis (positividad para anexina V, pero no 7-AAD) alcanzó un máximo a aproximadamente el 14-17%, 48 horas tras la retirada de citoquinas. Células necróticas, definidas por la positividad para 7-AAD, se acumularon de manera continua en estos cultivos tras la retirada de IL-2 y aproximadamente el 35% de las células en las poblaciones que carecen de soporte de citoquina eran necróticas o experimentaban apoptosis a las 72 horas. En cambio, PBL transducidos con IL-15 resistieron la apoptosis tras la retirada de IL-2. A lo largo de 72 horas, el porcentaje de células apoptóticas aumentó ligeramente desde el 4,3 hasta el 5,7%, mientras que las células necróticas aumentaron desde el 3,5 hasta el 6,4%.

10 Ejemplo 17

Este ejemplo demuestra que PBL transducidos con IL-15 mantienen la expresión de Bcl-2 y Bcl-XL tras la retirada de IL-2.

15 Linfocitos CD8 de pacientes con VIH demuestran niveles disminuidos de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL que pueden revertirse mediante exposición a IL-15 (27). Debido a que los linfocitos transducidos con IL-15 resisten la apoptosis tras la retirada de citoquinas, se evaluaron linfocitos CD4 y CD8 para determinar la expresión de Bcl-2 y Bcl-XL (figuras 19 y 20). Se detectaron las proteínas intracelulares Bcl-2 y Bcl-XL usando anticuerpos conjugados con FITC y PE y sus respectivos controles de isotipo (BD Pharmingen y Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL). Se lavaron las células dos veces en tampón de tinción compuesto por PBS con BSA al 0,5% y se tiñeron con anticuerpos frente a la superficie celular o controles de isotipo coincidente seguido por incubación en la oscuridad durante 20 min. a 4°C. Entonces se lavaron las células dos veces más con tampón de tinción antes del análisis. Se realizó la tinción intracelular fijando y permeabilizando las células con disolución Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen), dos lavados en tampón Perm/Wash (BD Pharmingen), tiñendo con anticuerpos intracelulares o controles de isotipo, y dos lavados adicionales antes del análisis.

25 Los niveles de Bcl-2 y Bcl-XL se reprimían en células no transducidas y transducidas con el control 2 días tras la retirada de citoquinas. En cambio, la expresión de estas proteínas se mantuvo en linfocitos CD4 y CD8 transducidos con IL-15 tras la retirada de IL-2; se demostró que Bcl-XL no disminuía en expresión mientras que Bcl-2 presentaba una disminución modesta en la expresión (disminución del 18% y el 16% en células CD4 y CD8 transducidas con IL-15 frente a disminución del 47-48% y el 53-54% en cultivos de CD4 y CD8 control).

35 Ejemplo 18

Este ejemplo demuestra que el reconocimiento de péptidos específicos por linfocitos transducidos con IL-15 se mantiene tras la retirada de IL-2.

40 Para evaluar adicionalmente la función de linfocitos transducidos con IL-15, se generaron cultivos de linfocitos estimulados con péptidos con reactividad frente al antígeno de melanoma gp100 y posteriormente se transdujeron con el vector de IL-15 con codones optimizados. Linfocitos no transducidos y transducidos con IL-15 presentaban patrones de tinción idénticos con tetrámero de gp100, con un 50-80% de células CD8 que se teñían positivamente tras una ronda de estimulación con péptidos (datos no mostrados). Posteriormente, se realizaron experimentos de cocultivo utilizando células T2 pulsadas con péptidos como estimuladores. Se llevó a cabo el ensayo de reactividad frente a antígenos de linfocitos tal como sigue: se prepararon células diana pulsando células T2 con 10-1000 ng/ml de péptido en medio de cultivo celular durante 2 h a 37°C. Se usaron los siguientes péptidos restringidos por HLA-A2: péptido de influenza (GILGFVFTL) (SEQ ID NO: 9), péptido MART-1:27-35 o gp100:209-217 nativo. Se cocultivaron 1×10^5 células efectoras (PBL) con 1×10^5 células diana (T2 pulsadas con péptidos) en un volumen final de 0,2 ml en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. 24 horas después, se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se sometieron a ensayo para determinar la producción de interferón- γ mediante ELISA (Endogen).

55 Se liberaron cantidades comparables de IFN- γ por linfocitos control y transducidos con IL-15 tras la exposición a células T2 pulsadas con diluciones en serie del péptido gp100 (figura 21). Se demostró reactividad específica de péptido mediante la secreción de IFN- γ tras el cultivo de linfocitos control y transducidos con IL-15 con células T2 pulsadas con gp100, pero no el péptido de influenza restringido por HLA-A2 (gripe). Se observó reactividad frente al péptido MART sólo en el cultivo transducido con el receptor de células T MART (figura 22). Cuando se retiró la IL-2 de los cultivos de linfocitos, cultivos control (no transducidos y transducidos con TCR de MART) disminuyeron en viabilidad y número mientras que linfocitos transducidos con IL-15 siguieron siendo viables; esto era similar al patrón demostrado previamente en linfocitos activados por OKT3 (datos no mostrados). 5 días tras la retirada de IL-2, se sometieron a prueba las células de nuevo para determinar la reactividad de péptidos contra células diana pulsadas T2; los cultivos control demostraron una disminución de la secreción de IFN- γ tras encontrarse con células T2 pulsadas con gp100, mientras que las células transducidas con IL-15 mantenían un alto nivel de secreción de IFN- γ específica (figura 23).

65

ES 2 382 775 T3

Ejemplo 19

Este ejemplo demuestra la capacidad del TIL transducido para proliferar tras la estimulación con células dendríticas alogénicas (alo-CD).

5 Se plantea la hipótesis de que la estimulación con células alo-CD de TIL se potenciaría en las células transducidas con citoquinas de cadena gamma común. Además, las células dendríticas pueden capturar IL-15 mediante el IL-15R α y presentarla en trans a células T (que no expresan el IL-15R α).

10 Se generaron CD alogénicas y se cocultivaron con el TIL durante 4 días en ausencia de IL-2 exógena. Se añadió ³H-timidina al cultivo en las últimas 18 horas de cultivo. Las células transducidas con IL-15 presentaban la mayor capacidad para proliferar (figura 26). IL-2 también presentaba la capacidad para proliferar tras la estimulación con CD alogénicas.

15 Este ejemplo demostró la capacidad de células que expresan IL-2, IL-7 e IL-15 para proliferar en ausencia de citoquina exógena.

Ejemplo 20

20 Este ejemplo demuestra que PBL transducidos presentan supervivencia potenciada en ausencia de citoquina exógena en el medio de cultivo.

25 Se estimularon PBL aislados del paciente JS con OKT3 y entonces se transdujeron con vectores retrovirales que codifican IL-2, IL-7 o IL15. Entonces se cultivaron las células en ausencia de citoquina exógena durante hasta 40 días. Tal como se muestra en la figura 27, las células transducidas con IL-2, IL-7 o IL-15 presentaban supervivencia pasados 35 días, mientras que las células no transducidas no sobrevivieron pasados 20 días.

30 Este ejemplo demostró que células transducidas con vectores que codifican IL-2, IL-7 o IL-15 tienen supervivencia potenciada en ausencia de citoquina exógena y resisten la apoptosis inducida por la retirada de IL-2.

Ejemplo 21

35 Este ejemplo demuestra la capacidad de PBL transducidos con vectores retrovirales de IL-2, IL-7 o IL-15 para proliferar.

40 Se cocultivaron PBL transducidos con vectores retrovirales que codifican IL-2, IL-7 o IL-15 durante 3 días con CD alogénicas y se pulsaron con ³H-timidina en las últimas 18 horas de cultivo. Tal como se muestra en la figura 29, los PBL transducidos presentaban la capacidad para proliferar en respuesta a la estimulación con CD alogénicas, en ausencia de citoquina exógena, mientras que las células no transducidas demostraron muy poca, si había alguna, capacidad para proliferar en las mismas condiciones. Sin embargo, las células no transducidas podían proliferar en presencia de IL-2, IL-7 o IL-15 exógena en los medios (figura 28).

45 Este ejemplo demostró la capacidad de PBL transducidos con IL-7 o IL-15 para proliferar en ausencia de citoquina exógena.

Ejemplo 22

50 Este ejemplo demuestra un método de construcción de un vector que codifica IL-15 y que comprende un gen suicida y un método para someter a prueba la expresión de cada gen.

55 Se construyeron ocho constructos retrovirales que comprenden el gen de IL-15 con codones optimizados o salvaje y el gen de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS) con codones optimizados o salvaje en la estructura principal de pMSGV: pMSGV-wtHSVtk-IRES-CO IL15, pMSGV-wtHSVtk-PGK-CO IL15, pMSGV-wtIL15-PGK-wtHSVtk, pMSGV1-CO-IL-15-IRES-CO-HSV-TK, pMSGV1-wtIL15-IRES-wtHSVtk, pMSGV1ppl-CO IL15-IRES-wtHSVtk, pMSGV1ppl-CO IL15-PGK-COHSV TK y pMSGV1ppl-CO IL15-PGK-wtHSVtk. Específicamente, se modificó IL-15 salvaje o con codones optimizados mediante la inserción de genes de TK de VHS salvaje o con codones optimizados cuando la expresión de la TK de VHS está mediada por o bien un elemento IRES o bien usando el promotor de PGK. La estructura del vector está indicada por el nombre del vector. Por ejemplo, el vector pMSGV-wtHSVtk-IRES-CO IL15 tiene el gen de TK de VHS precediendo al elemento IRES, que precede al gen de IL-15 con codones optimizados.

60 Para determinar si tanto IL-15 como TK de VHS pueden expresarse en células transducidas con los vectores, se transfectan células empaquetadoras retrovirales Phoenix Eco con los ocho vectores de gen suicida diferentes (y vectores de IL-15 sin la TK de VHS). El sobrenadante retroviral se aplica a placas recubiertas con Retronectin, que entonces se usan para transducir células NIH/3T3. También se transducen las células con el vector retroviral GFP (MSGIN) como control.

ES 2 382 775 T3

En el día 0, se siembran en placa células NIH/3T3 con diluciones en serie de ganciclovir (GCV) (0, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 y 10 μ M). En el día 1, se reemplazaron los medios de estos cultivos celulares. En el día 2, se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se sometieron a prueba mediante ELISA para detectar IL-15. Además, se determinaron los números de células vivas mediante exclusión de azul tripano. Los recuentos celulares disminuían con las dosis crecientes de GCV para todas las células transducidas con un vector que codifica TK de VHS o bien con codones optimizados o bien salvaje, mientras que los recuentos celulares de células transducidas con vectores control, MSGIN, wtIL-15 y CO-IL-15 no aumentaban de una manera dependiente de la dosis de GCV. Además, las cantidades de IL-15 disminuían de una manera dependiente de la dosis de GCV en cultivos celulares de células transducidas con vectores que codifican TK de VHS o bien salvaje o bien con codones optimizados e IL-15 salvaje o con codones optimizados, mientras que no se producía IL-15 por células transducidas con el vector control MSGIN y las cantidades de IL-15 no aumentaban de una manera dependiente de la dosis para células transducidas con un vector que carece del gen de TK de VHS.

Para determinar si los vectores de IL-15/TK pueden expresarse por linfocitos T, se estimulan PBL con OKT3 y se cultivan en medios que contienen IL-2. En los días de cultivo 2 y 3, se transducen las células en placas de Retronectin recubiertas previamente con sobrenadantes retrovirales. El sobrenadante de vector de IL-15 se diluye 1:4 y se usa como condición control. En el día de cultivo 6, se realiza un ensayo de producción de citoquinas de 3 días, en el que la producción de citoquina se somete a ensayo mediante ELISA.

El uso de los términos “un” y “una” y “el/la” y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Las expresiones “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como expresiones de extremos abiertos (es decir, que significan “que incluye, pero no se limita a”) a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende simplemente sen/ir como método de abreviatura de la referencia individual a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionase individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionadas en el presente documento, pretende simplemente esclarecer mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un linfocito T aislado que expresa al menos un polinucleótido recombinante que codifica una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de una respuesta inmunitaria, en donde el polinucleótido recombinante comprende una secuencia codificante no nativa, con codones optimizados que codifica la citoquina, y en donde la citoquina es IL-15 y la secuencia codificante comprende SEQ ID NO: 4.
- 10 2. El linfocito T aislado según la reivindicación 1, en donde el linfocito T sobrevive *in vitro* en ausencia de una citoquina exógena durante al menos 40 días.
3. El linfocito T aislado según la reivindicación 1, en donde el linfocito T sobrevive *in vitro* en ausencia de una citoquina exógena durante al menos 180 días.
- 15 4. El linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el linfocito T prolifera *in vitro* en ausencia de una citoquina exógena.
5. El linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el linfocito T resiste la apoptosis inducida por la retirada de IL-2 *in vitro* en ausencia de una citoquina exógena.
- 20 6. El linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el linfocito T reconoce antígeno *in vitro* en ausencia de una citoquina exógena.
7. El linfocito T aislado según la reivindicación 1, en donde el linfocito T expresa un primer polinucleótido recombinante y un segundo polinucleótido recombinante,
- 25 en donde el primer polinucleótido recombinante codifica IL-15, y
en donde el segundo polinucleótido recombinante codifica IL-7.
- 30 8. El linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la secuencia codificante no nativa tiene un 50% o menos de la energía libre pronosticada de la secuencia codificante nativa.
- 35 9. El linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el polinucleótido recombinante, el primer polinucleótido recombinante o el segundo polinucleótido recombinante comprende un gen suicida.
10. El linfocito T aislado según la reivindicación 9, en donde el gen suicida es el gen de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS).
- 40 11. El linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el linfocito T es un linfocito infiltrante de tumor (TIL).
12. El linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el linfocito T es un linfocito T humano.
- 45 13. El linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el linfocito T comprende un receptor específico para un antígeno de un estado médico.
- 50 14. El linfocito T aislado según la reivindicación 13, en donde el receptor es un receptor de células T endógeno (TCR).
15. El linfocito T aislado según la reivindicación 13, en donde el receptor es un receptor quimérico recombinante.
- 55 16. El linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde el estado médico es cáncer.
17. El linfocito T aislado según la reivindicación 16, en donde el cáncer es melanoma.
18. Una población aislada de células que comprende el linfocito T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
- 60 19. Una composición farmacéutica que comprende el linfocito T según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o la población de células según la reivindicación 18, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 65 20. Uso del linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o la población de células según la reivindicación 18 en la preparación de un medicamento para tratar un estado médico en un mamífero, en donde el estado médico se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria y una inmunodeficiencia.

ES 2 382 775 T3

21. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 19 en la preparación de un medicamento para tratar un estado médico en un mamífero, en donde el estado médico se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria y una inmunodeficiencia.
- 5 22. El uso según la reivindicación 20 ó 21, en el que el linfocito T es autólogo para el mamífero.
23. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en donde se administra IL-2 al mamífero tras la administración del medicamento.
- 10 24. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en donde se administra quimioterapia no mieloablativa al mamífero antes de la administración del medicamento.
25. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en donde el mamífero se inmuniza con un antígeno de la enfermedad antes de la administración del medicamento.
- 15 26. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, en donde el linfocito T se expande *in vitro* antes de administrar del medicamento.
27. Una composición que comprende linfocitos T transformados con y que expresan al menos un polinucleótido recombinante que codifica una citoquina que potencia la supervivencia de linfocitos T durante la fase de contracción de la respuesta inmunitaria, en donde el polinucleótido recombinante comprende una secuencia codificante no nativa, con codones optimizados que codifica la citoquina, y en donde la citoquina es IL-15 y la secuencia codificante comprende SEQ ID NO: 4.
- 20 28. El linfocito T aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, la población de células según la reivindicación 18 o la composición farmacéutica según la reivindicación 19 para su uso en el tratamiento de un estado médico en un mamífero, en donde el estado médico se selecciona del grupo que consiste en un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria y una inmunodeficiencia.
- 25 29. El linfocito T aislado, la población de células o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 28, en donde el linfocito T es autólogo para el mamífero.
- 30 30. El linfocito T aislado, la población de células o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 28 ó 29, en donde se debe administrar IL-2 al mamífero tras la administración del linfocito T aislado, la población de células o la composición farmacéutica.
- 35 31. El linfocito T aislado, la población de células o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, en donde se administra quimioterapia no mieloablativa al mamífero antes de la administración del linfocito T aislado, la población de células o la composición farmacéutica.
- 40 32. El linfocito T aislado, la población de células o la composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31, en donde el mamífero se inmuniza con un antígeno de la enfermedad antes de la administración del medicamento.
- 45 33. El linfocito T aislado, la población de células o la composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, en donde linfocito T debe expandirse *in vitro* antes de administrar el linfocito T aislado, la población de células o la composición farmacéutica.

50

55

60

65

Figura 1A

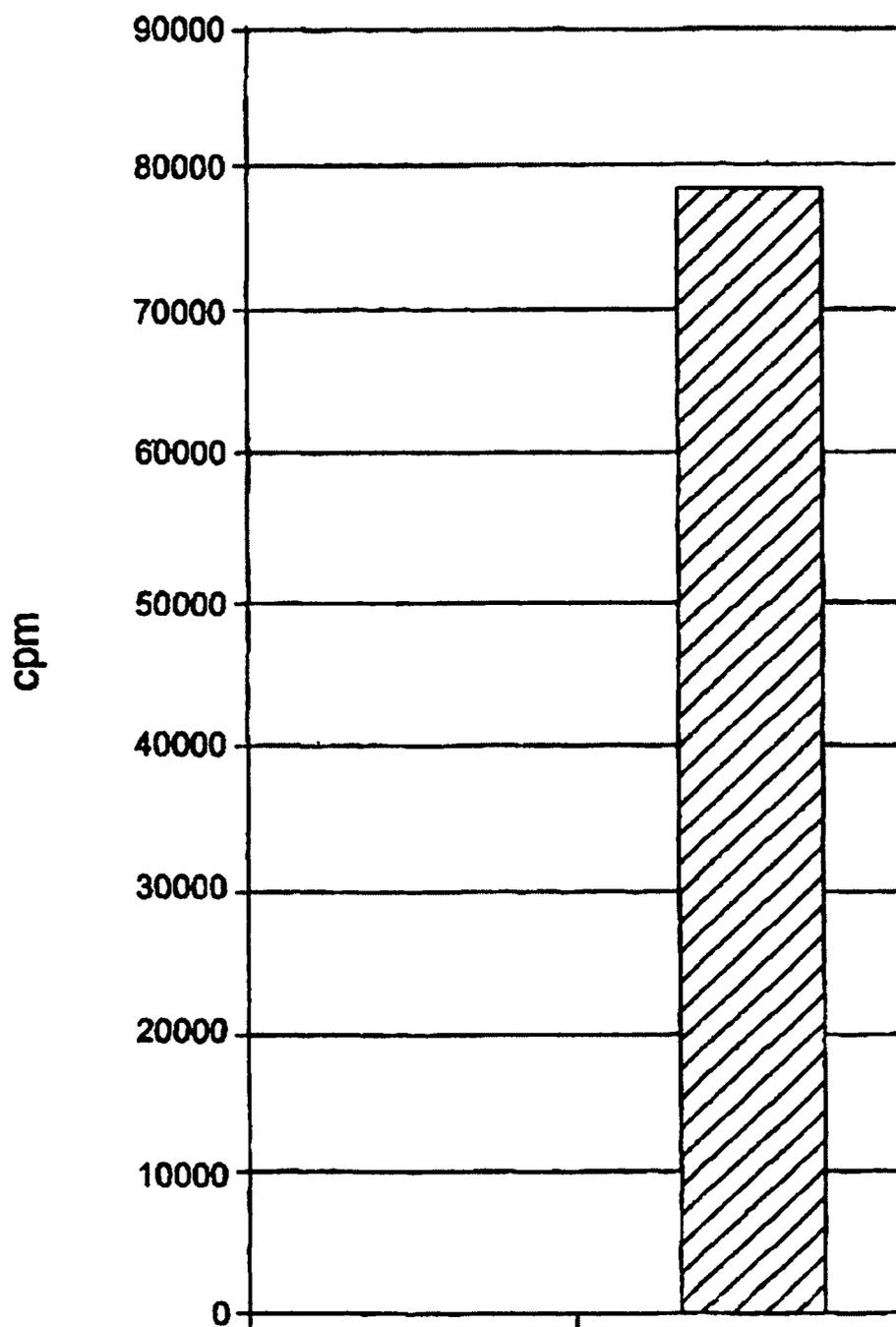


Figura 1B

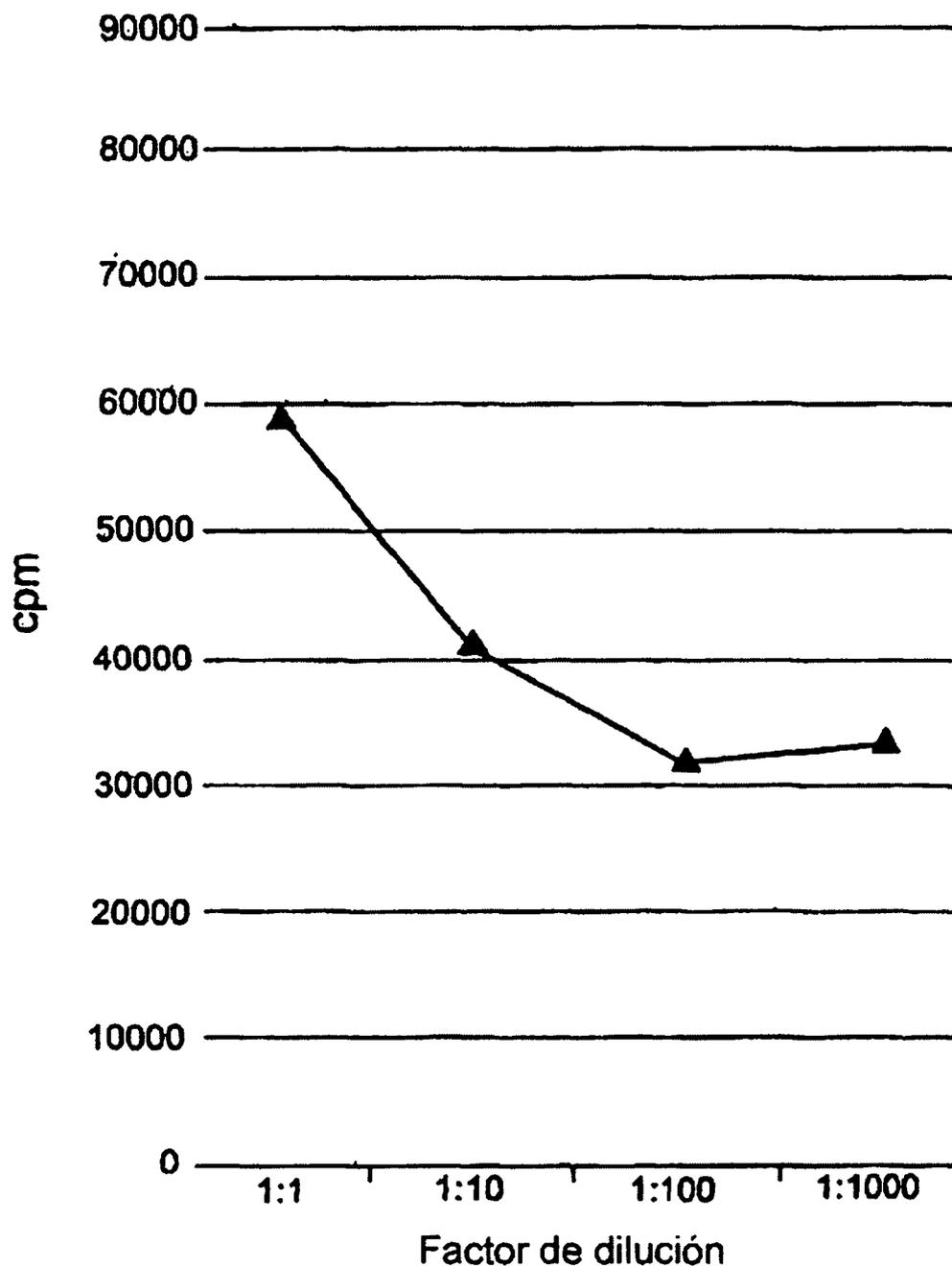


Figura 1C

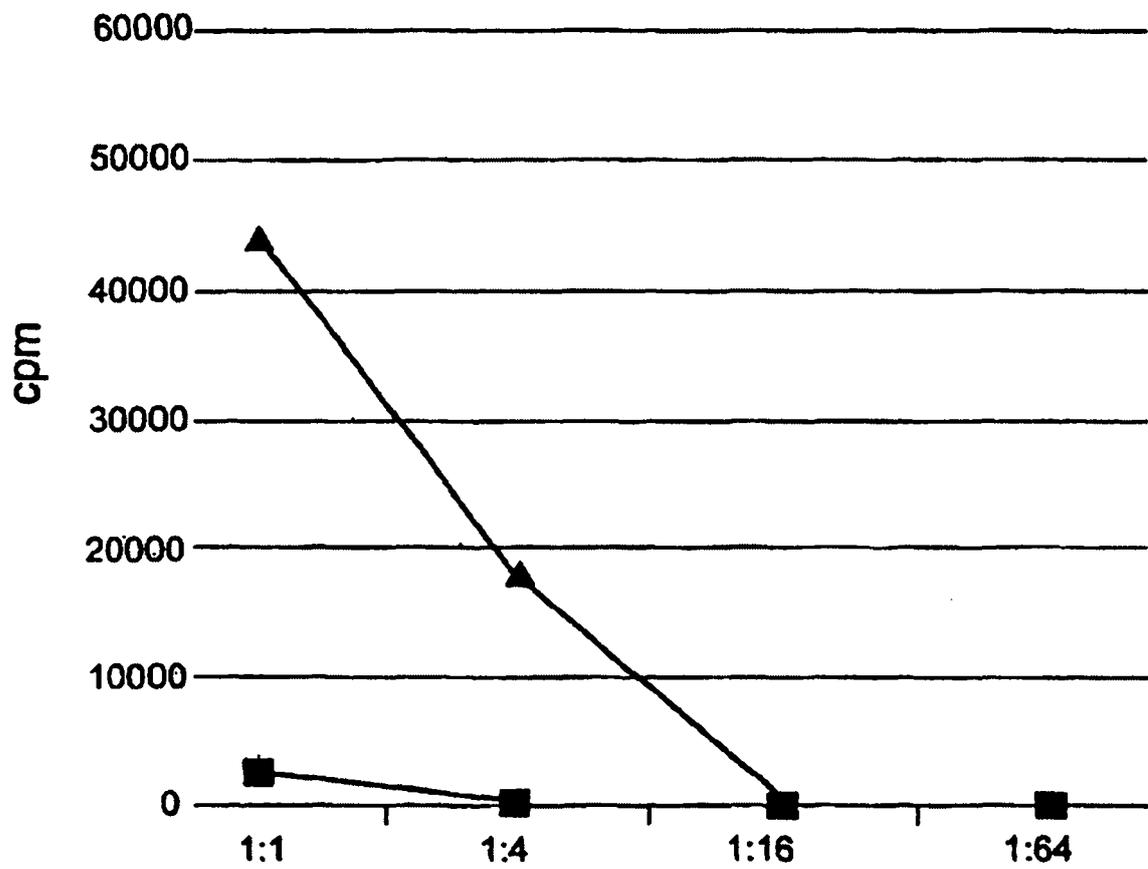


Figura 2

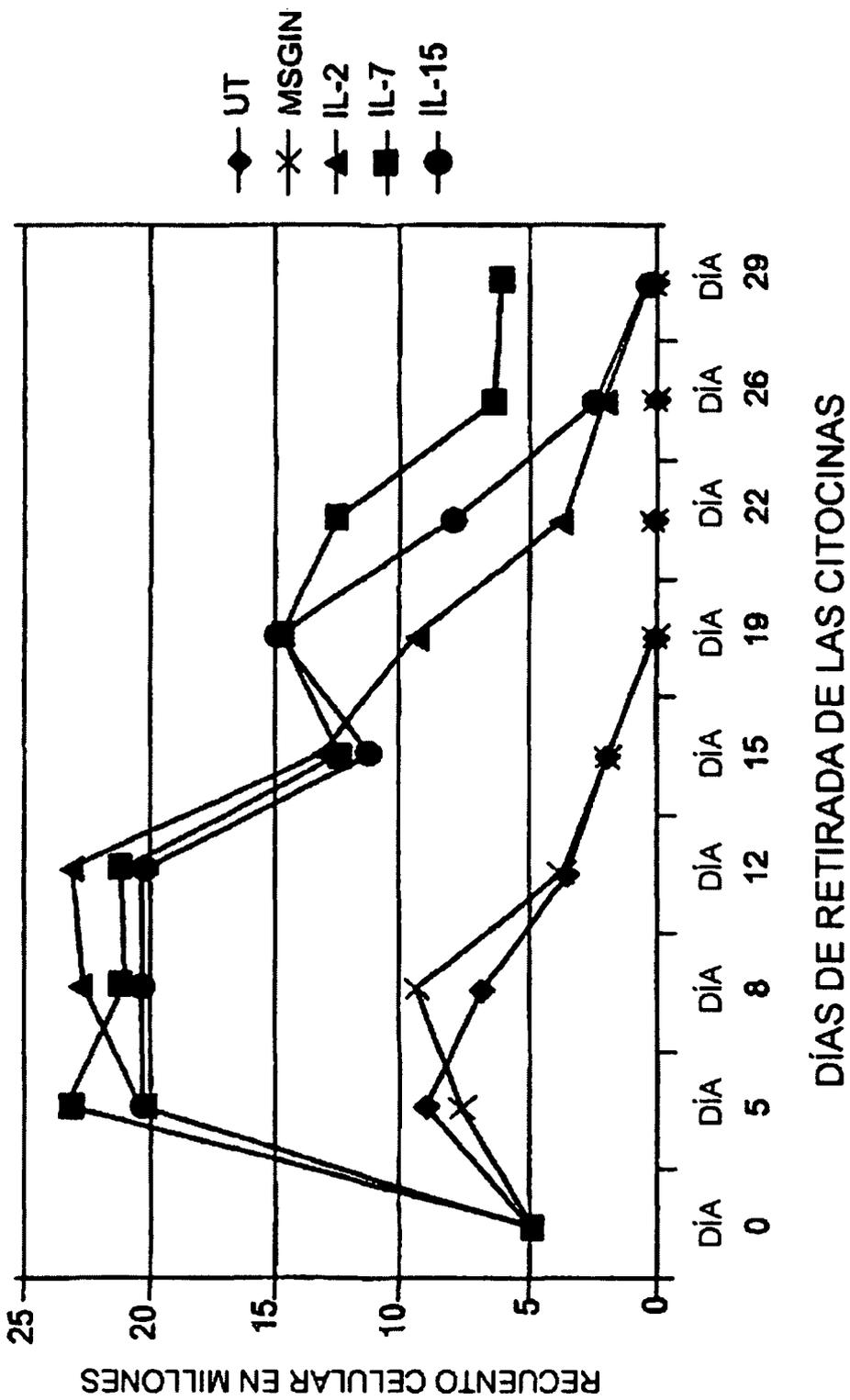


Figura 3

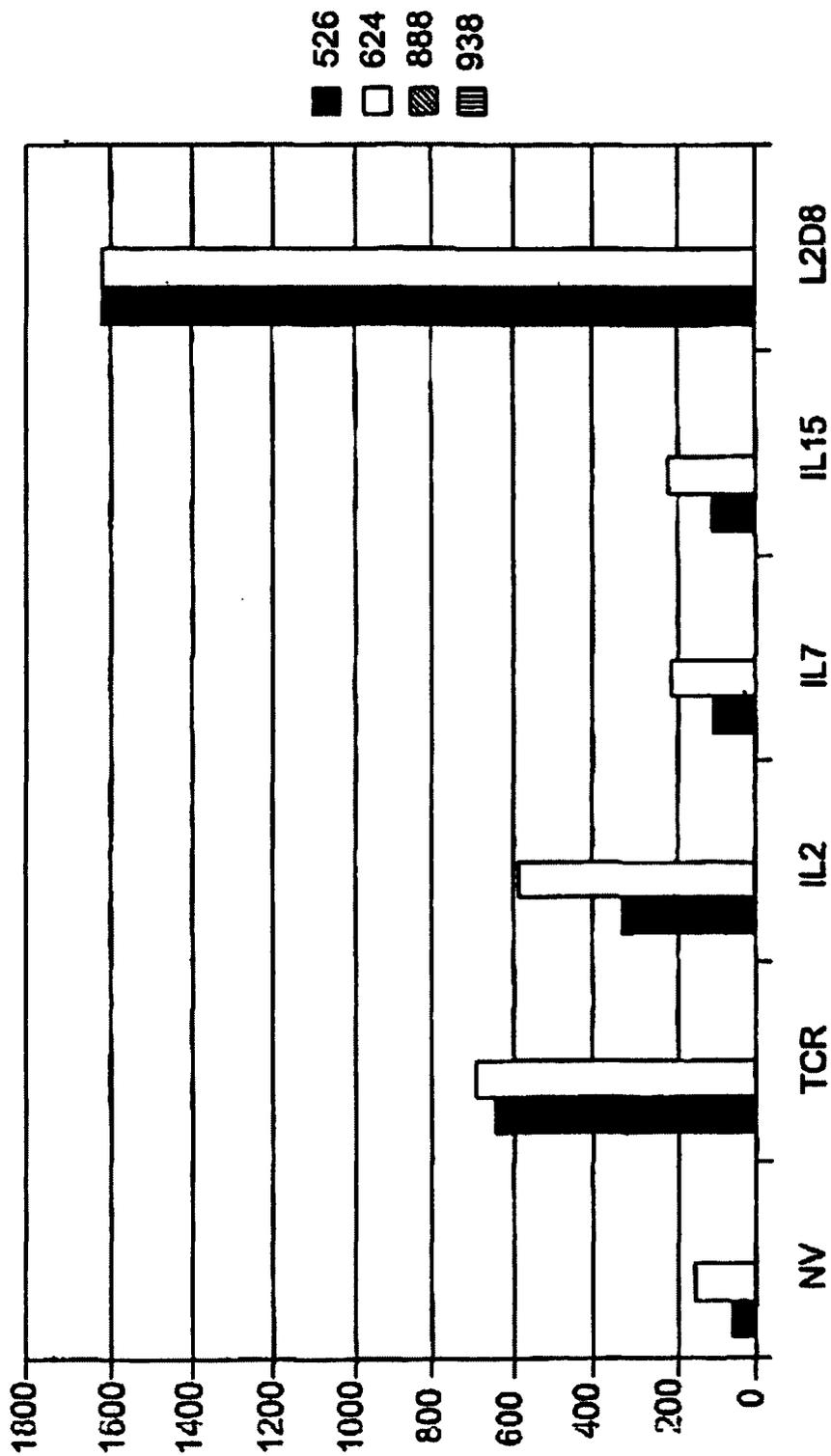


Figura 4

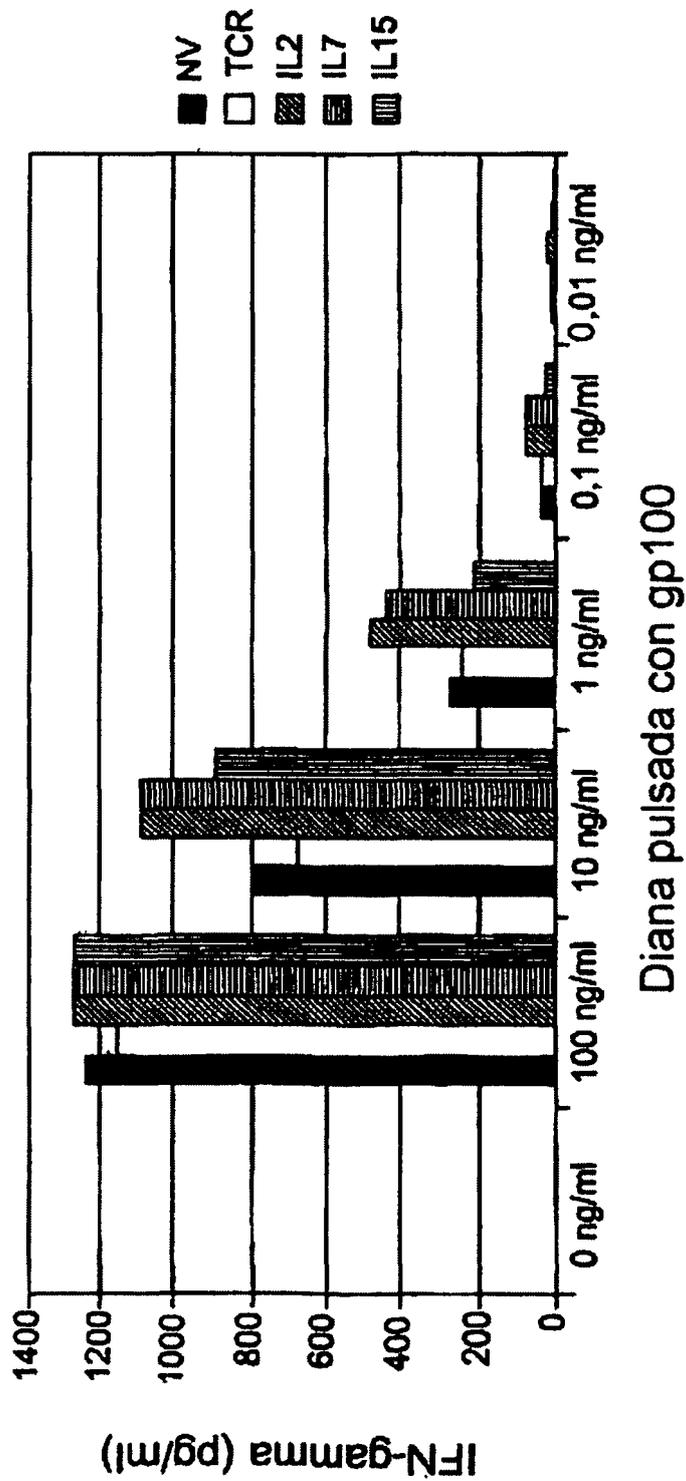


Figura 5

1 N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M

20 H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T

39 A M K C F L L E L Q V I S L E S G D A

58 S I H D T V E N L I I L A N N S L S S

77 N G N V T E S G C K E C E E L E E K N

96 I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S

Indica que se sustituyeron codones alternativos

* Indica el reemplazamiento de un codón salvaje con una frecuencia de uso <20%

Figura 6

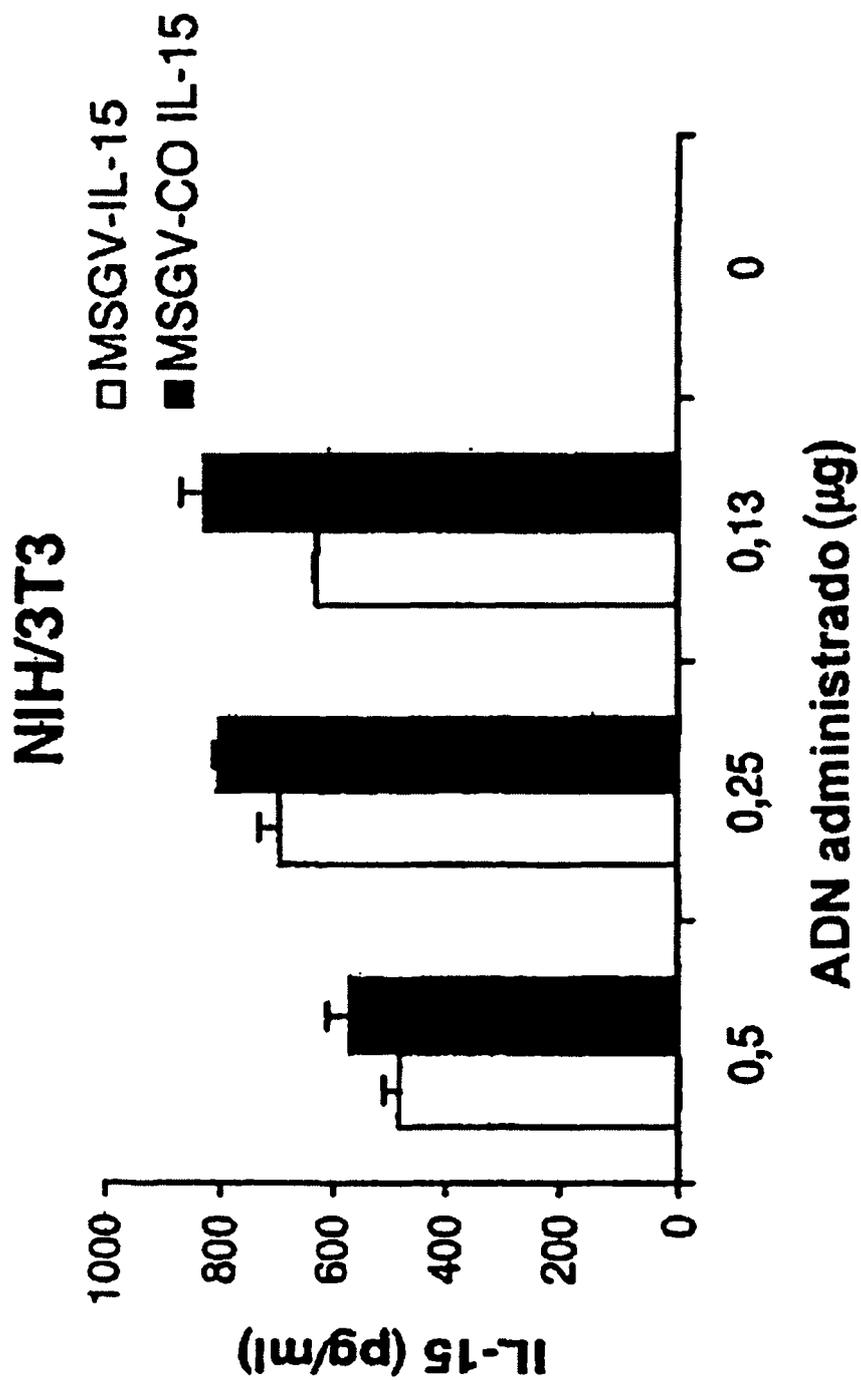


Figura 7

TE671

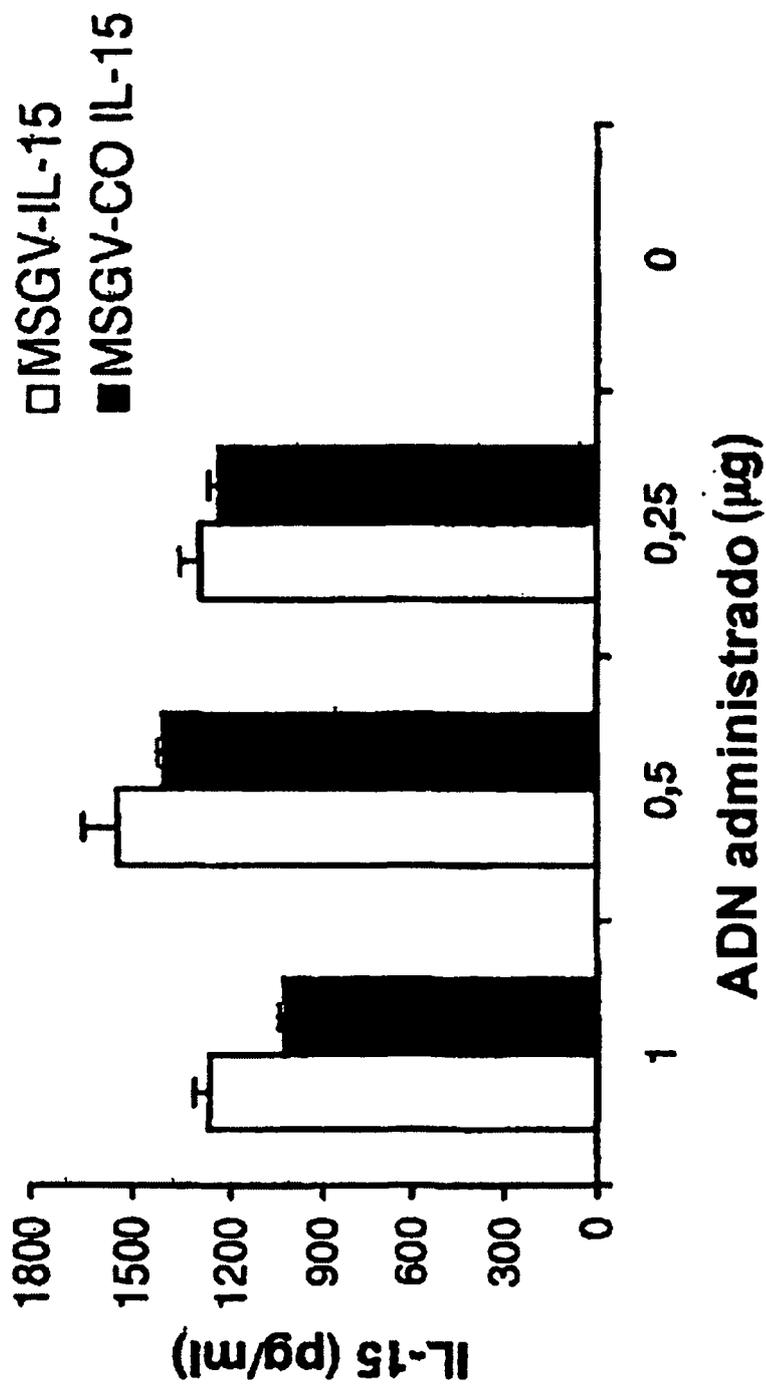
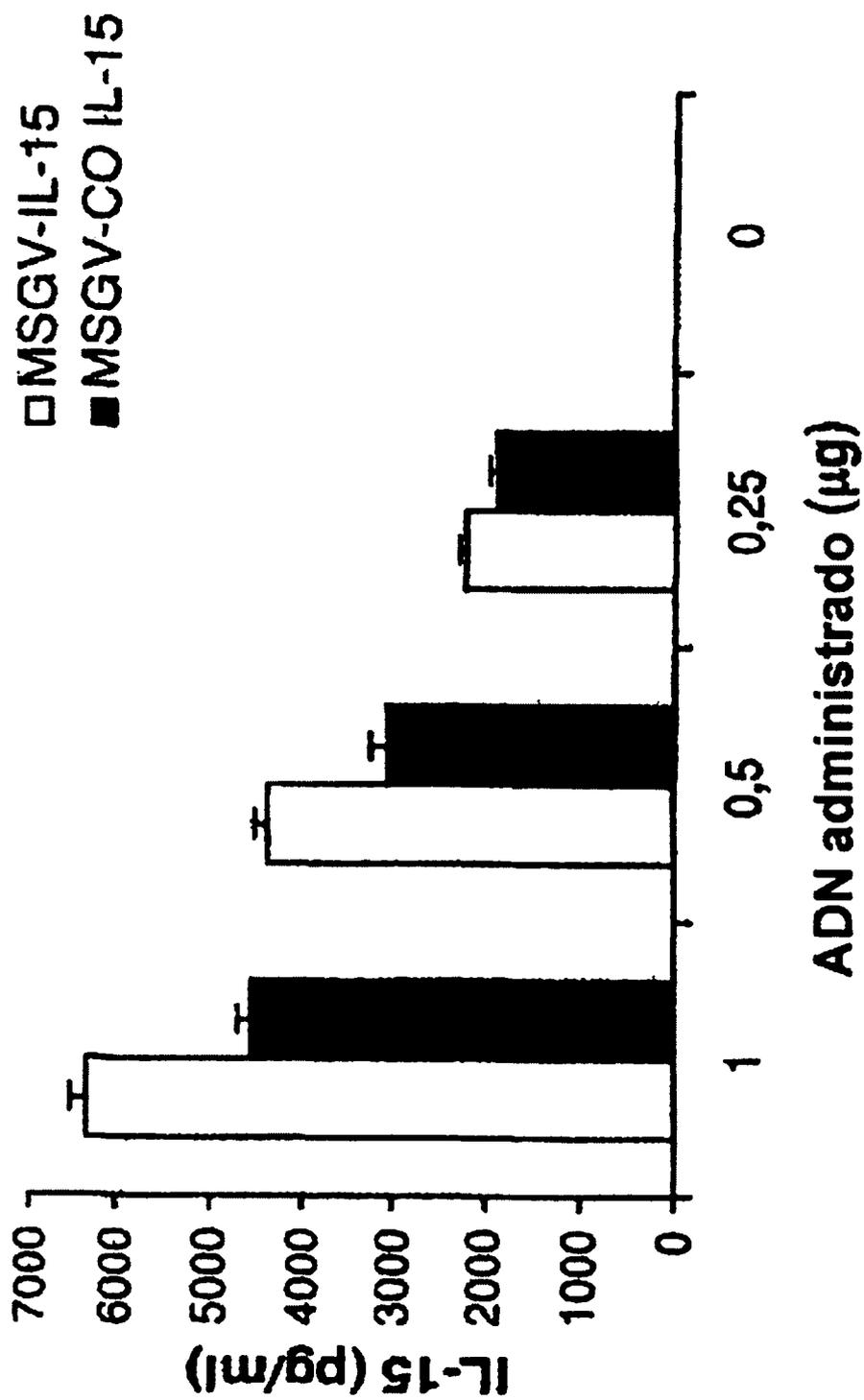


Figura 8

293T



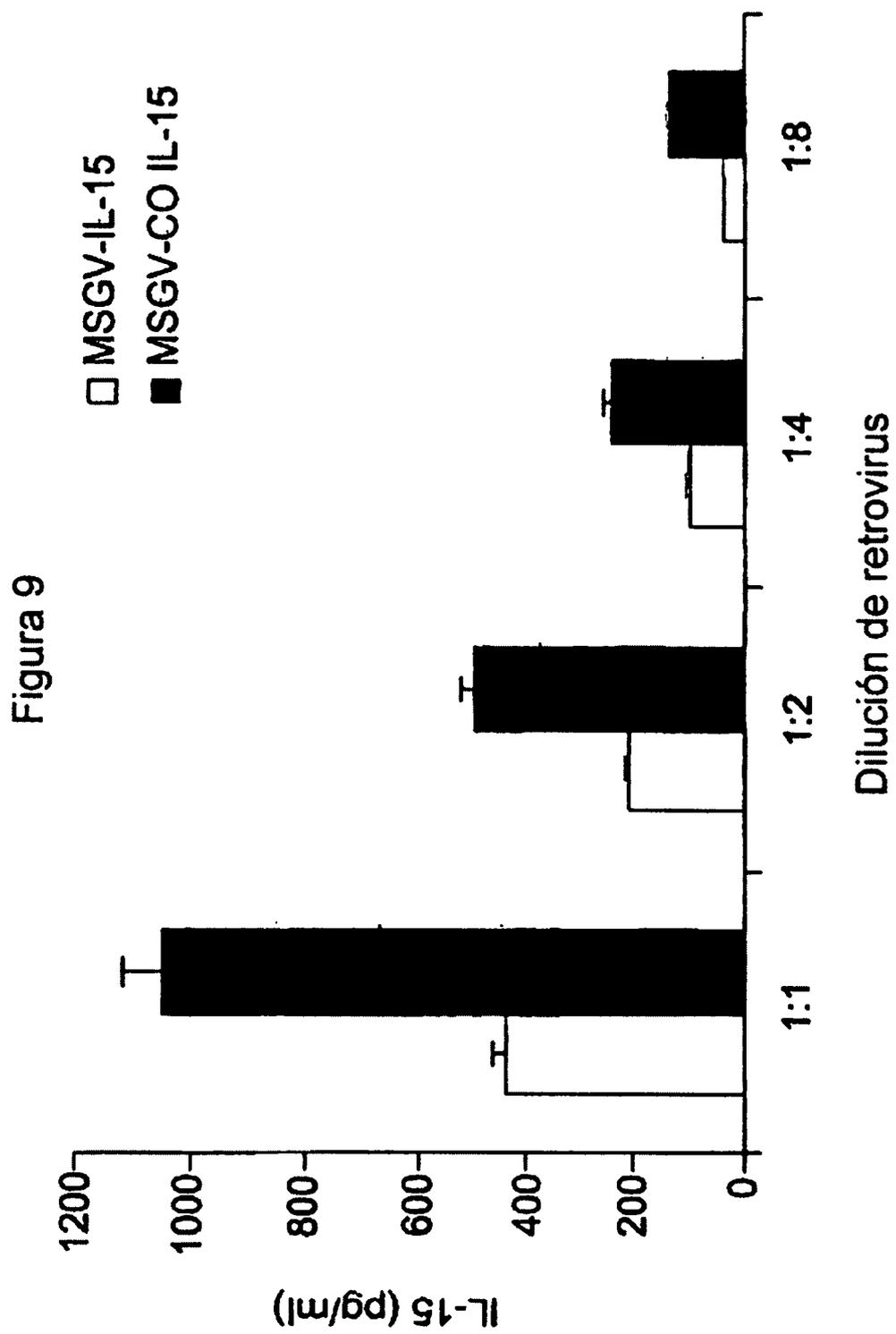
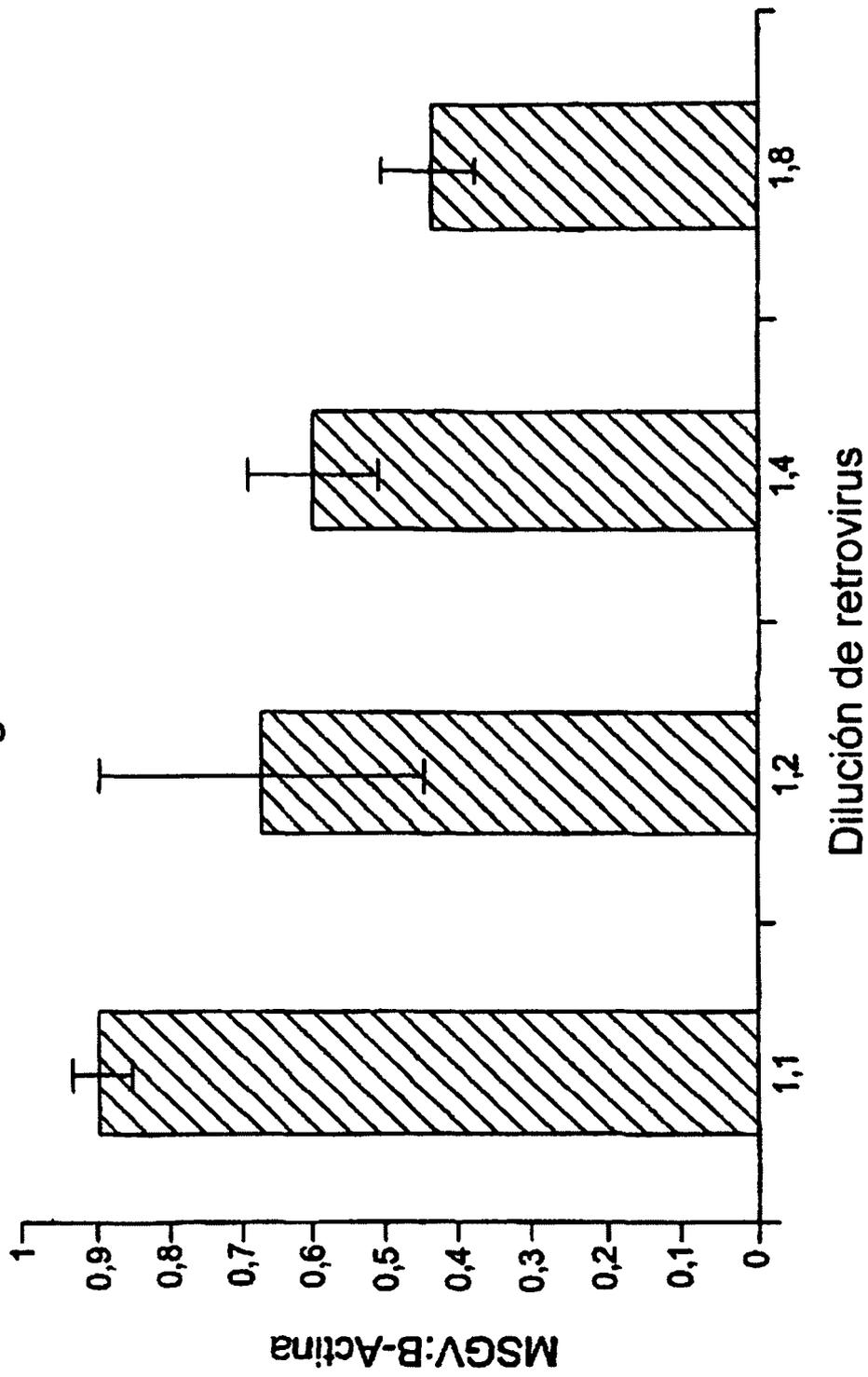


Figura 10



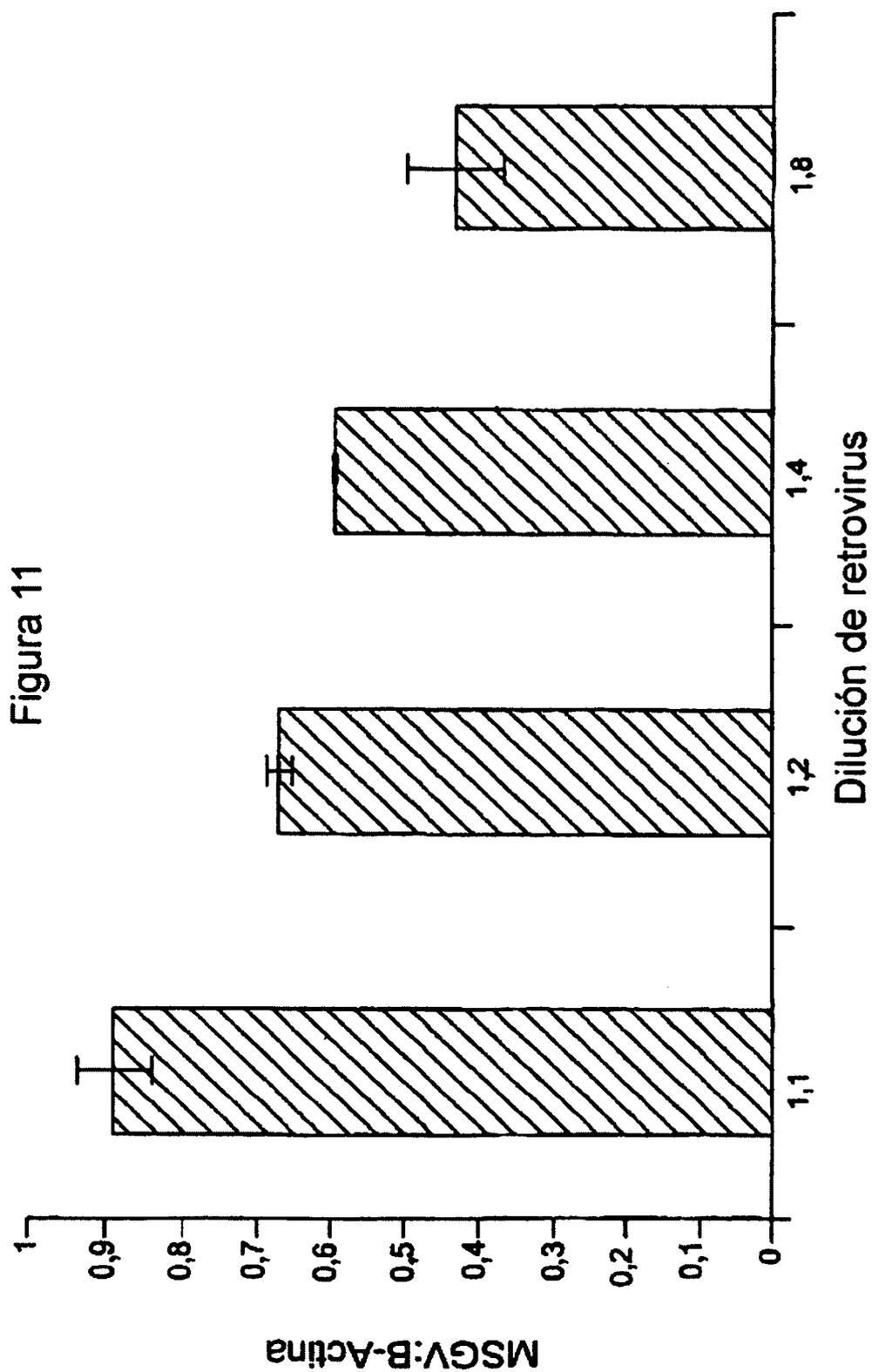
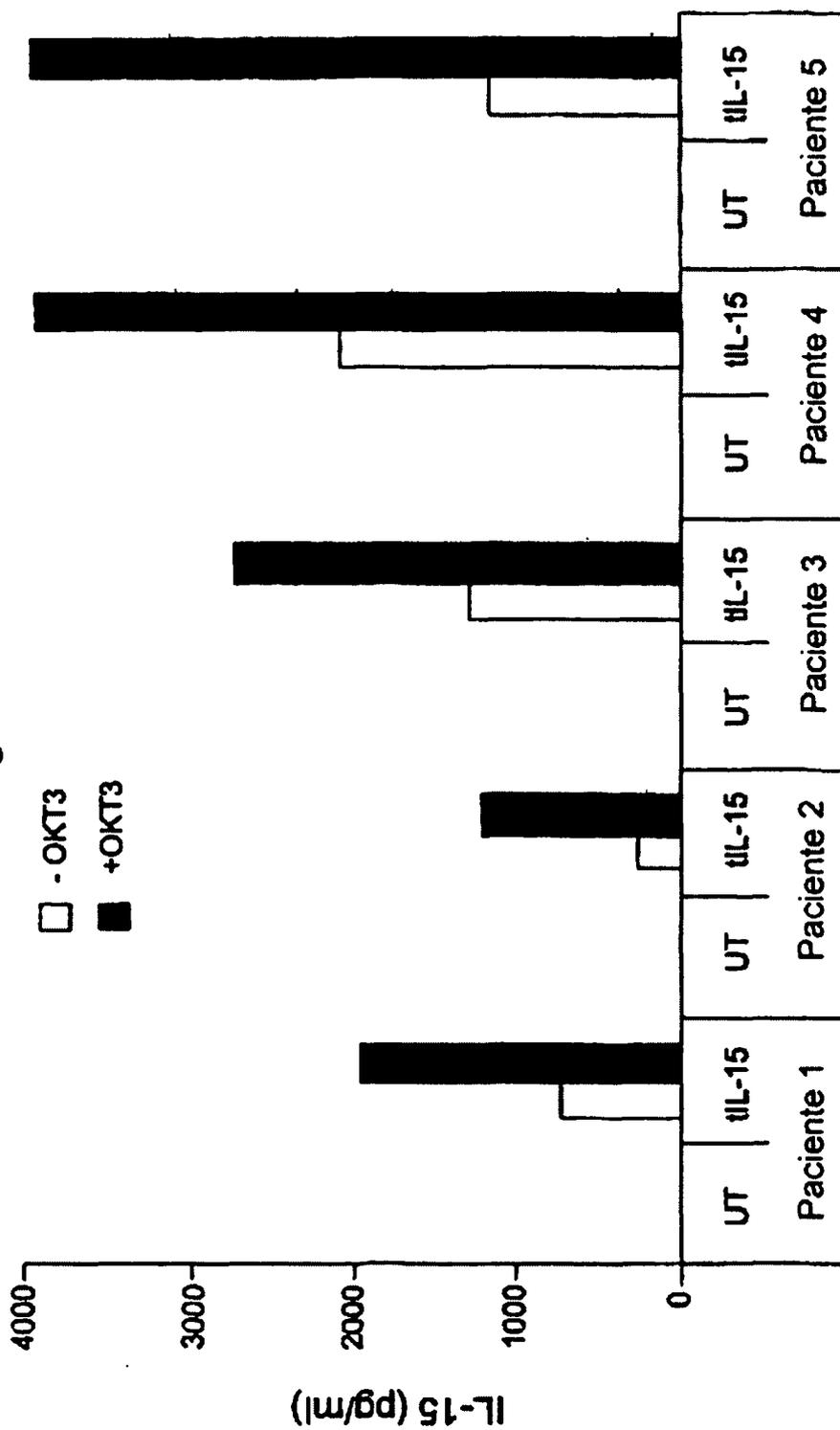


Figura 12



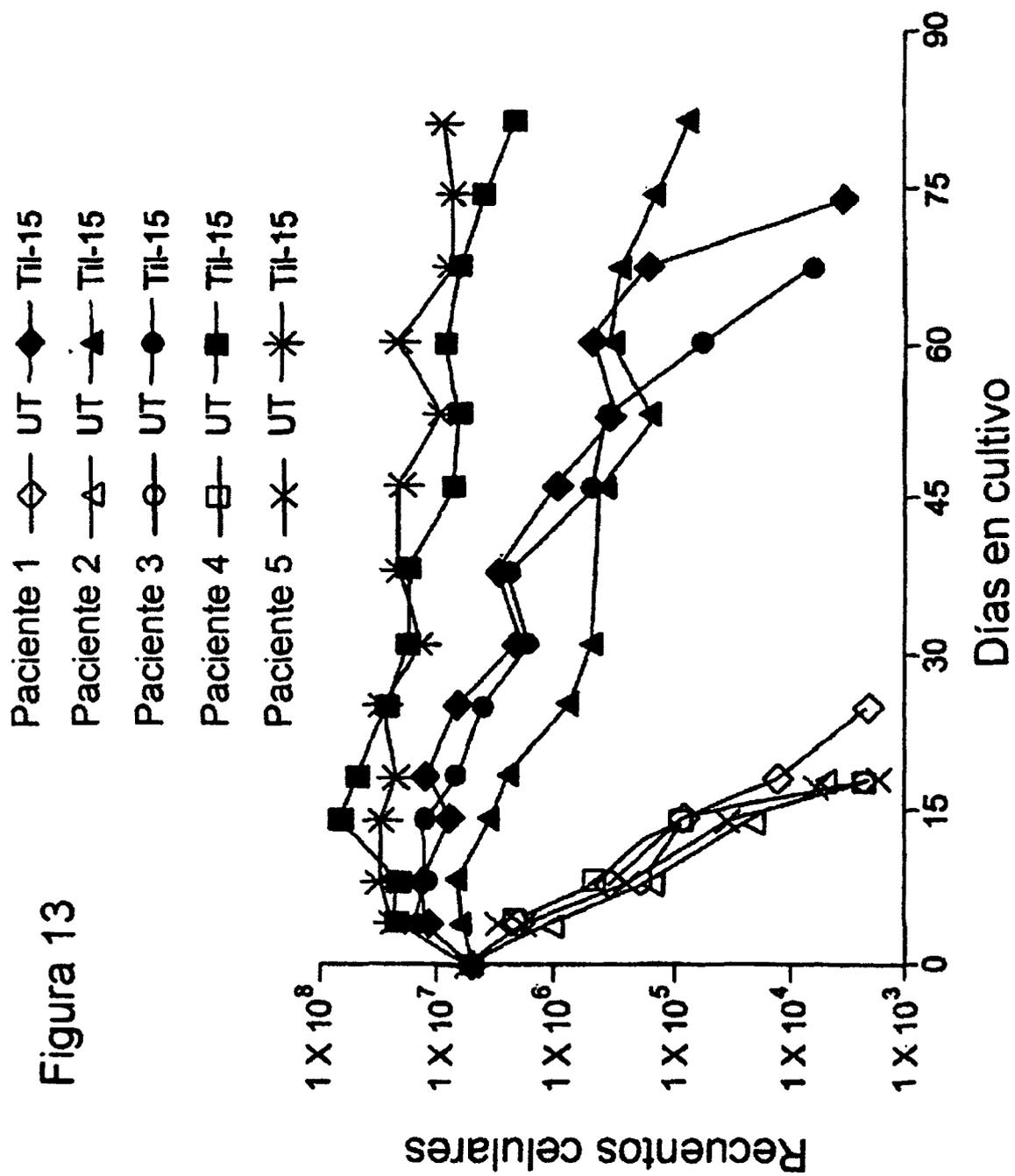


Figura 14

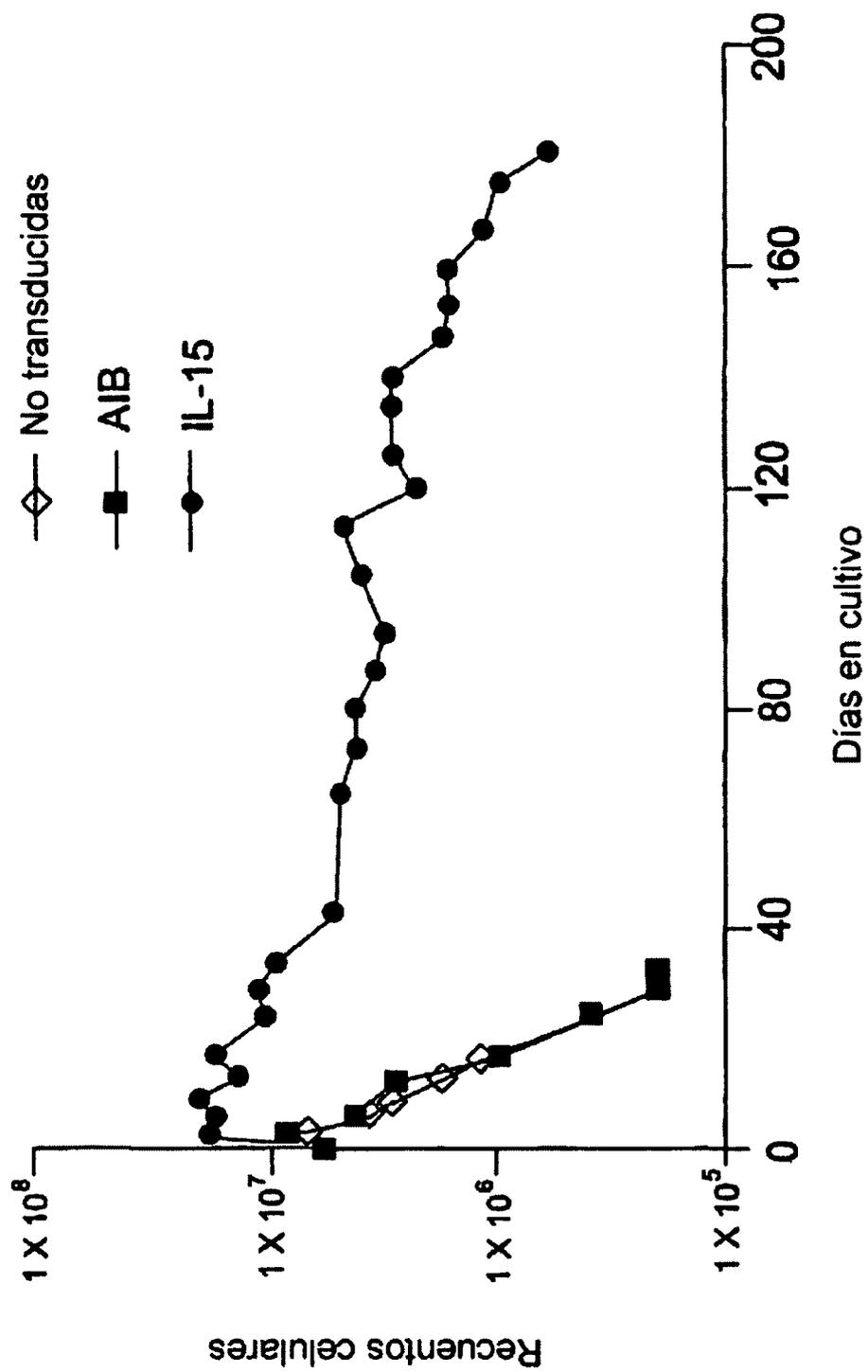


Figura 15

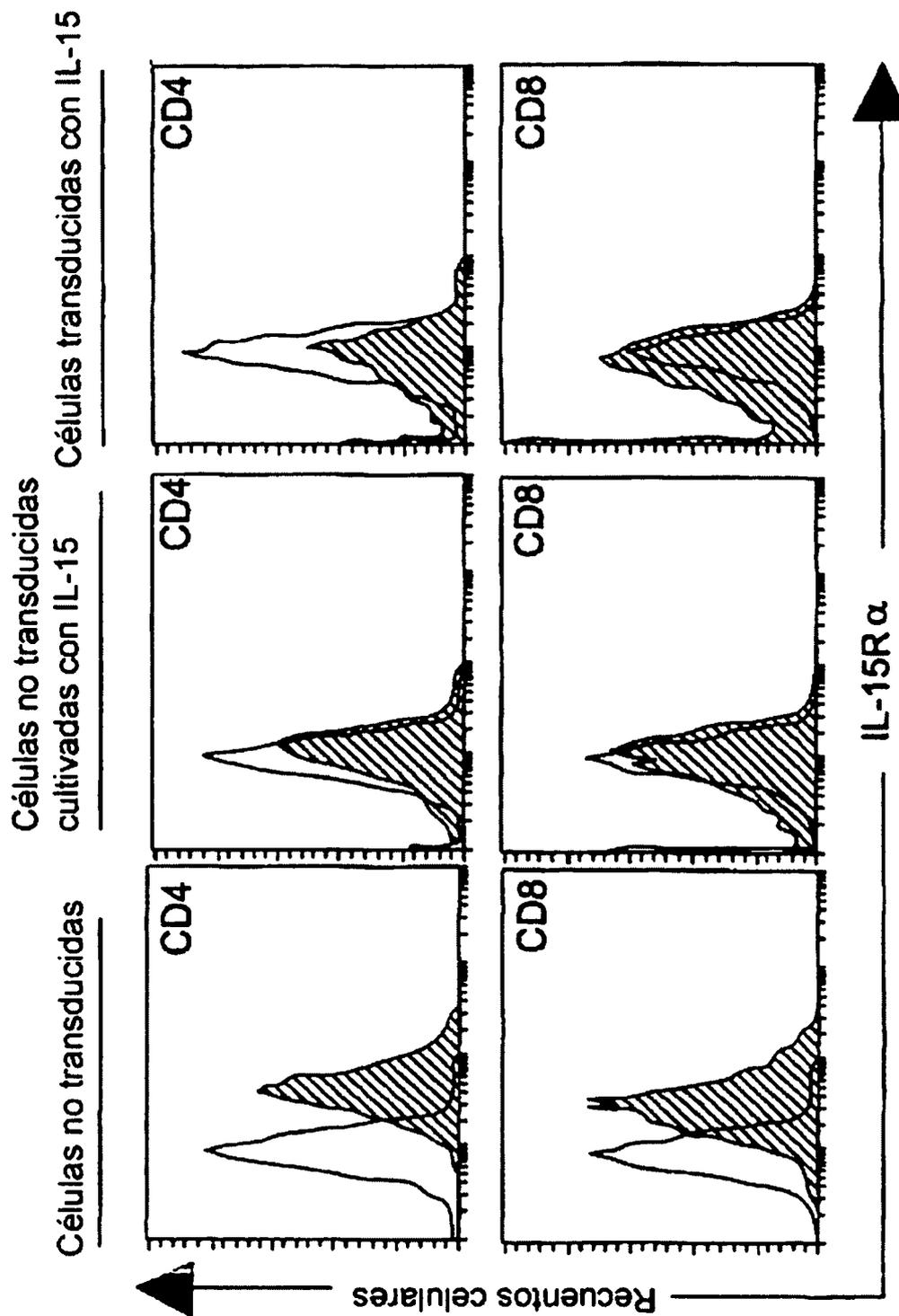


Figura 16

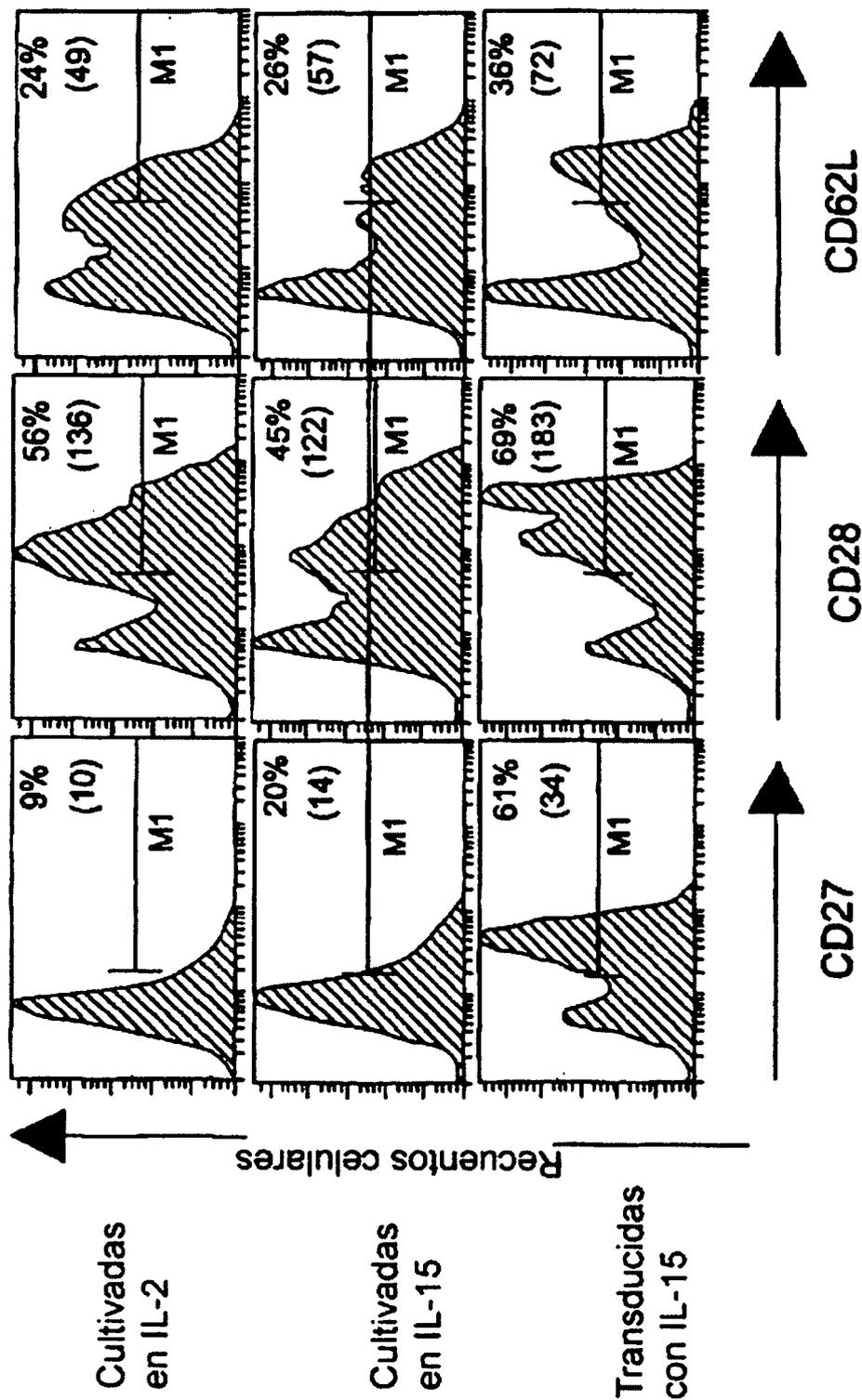


Figura 17

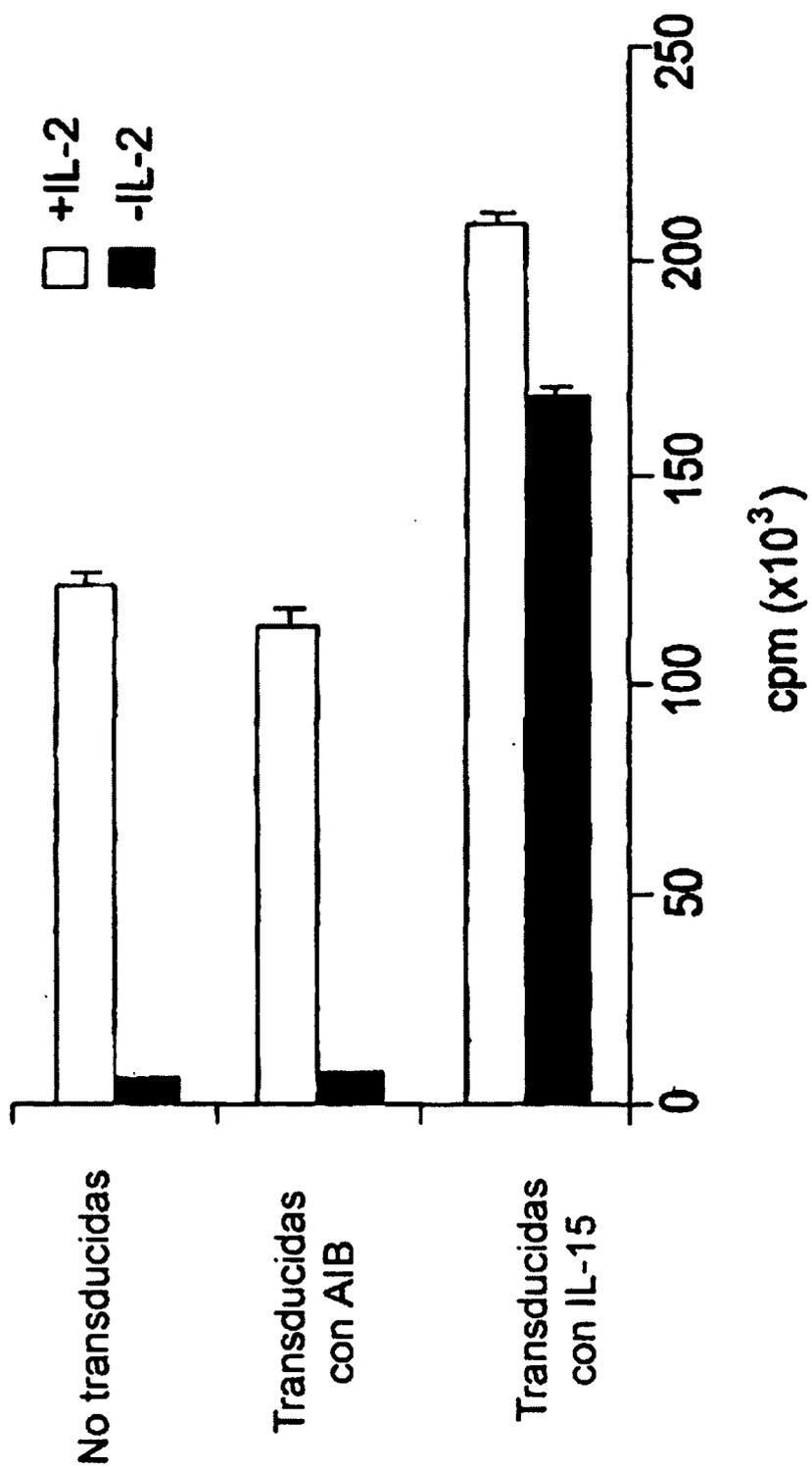


Figura 18

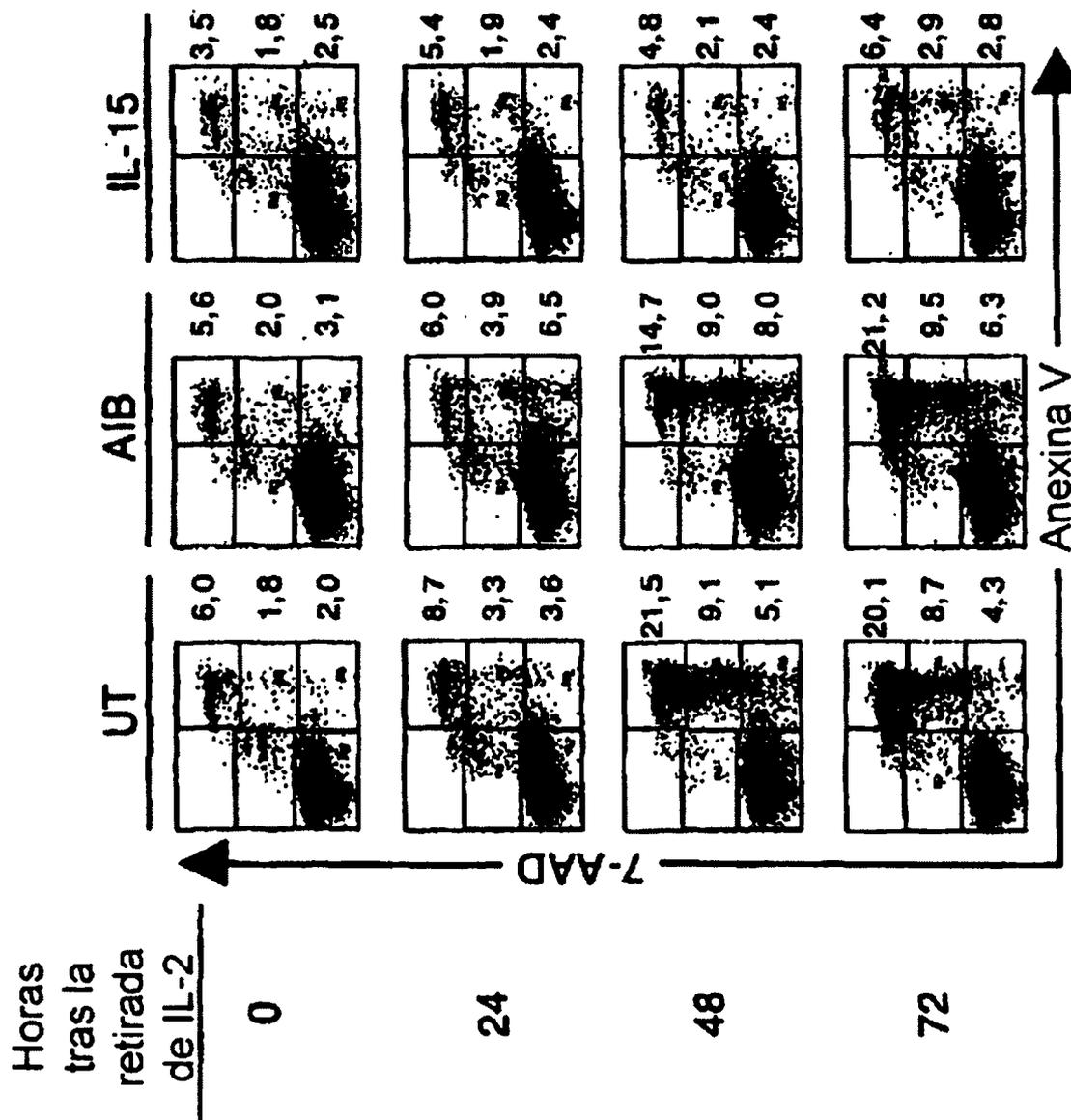


Figura 19

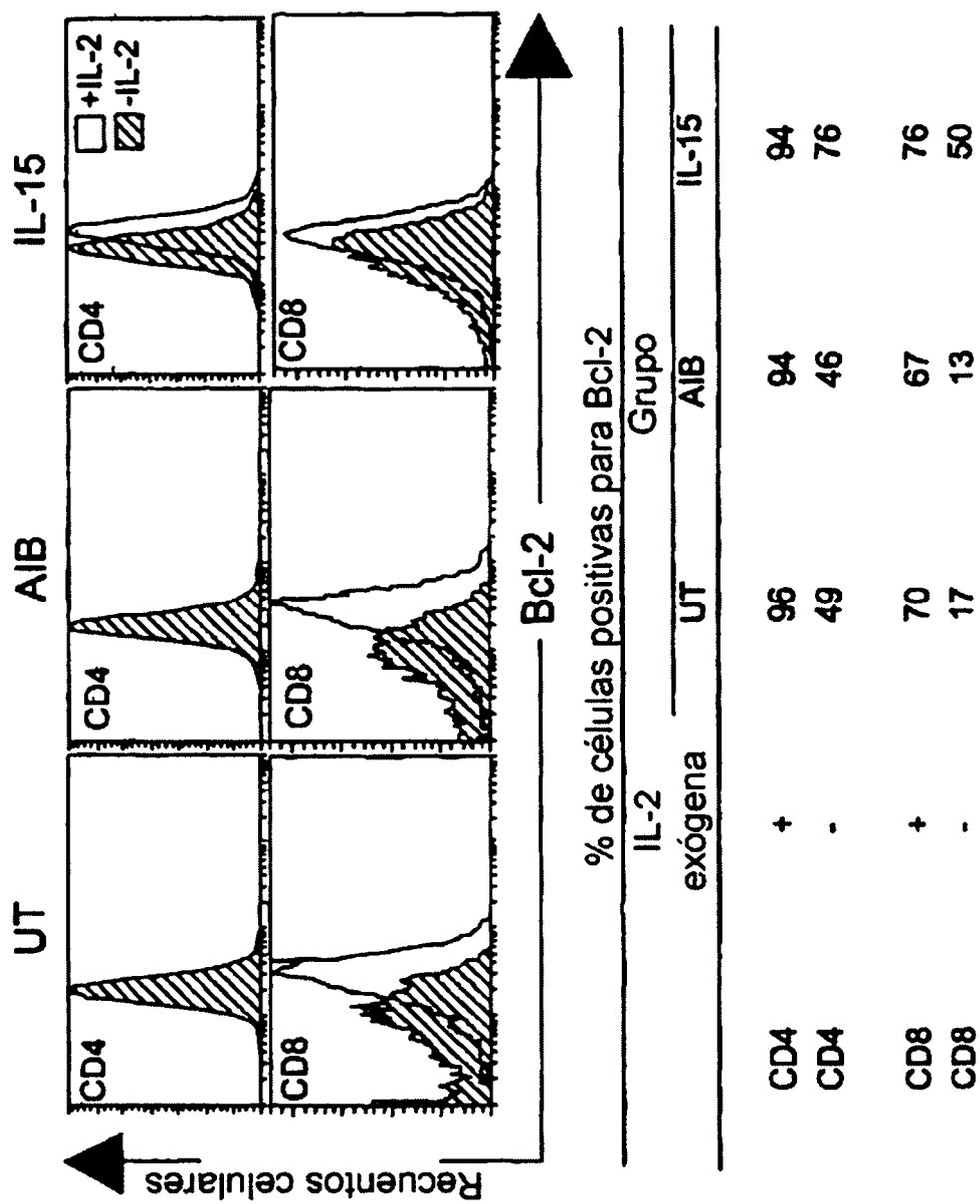
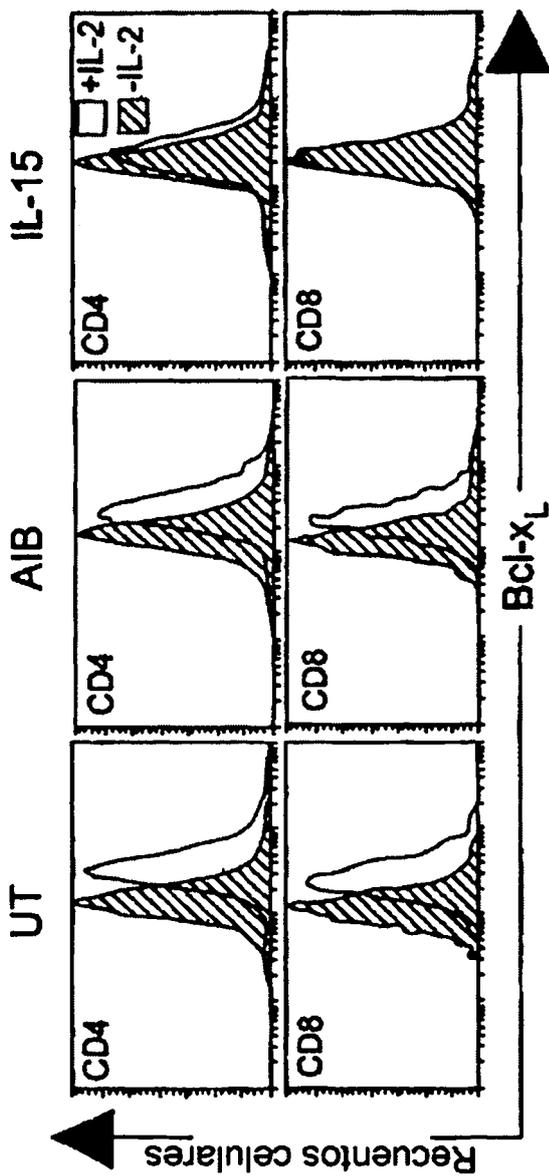


Figura 20



% de células positivas para Bcl-XL

| | IL-2 | | | Grupo | | |
|-----|---------|----|----|-------|-----|-------|
| | exógena | | | UT | AIB | IL-15 |
| CD4 | + | 97 | 97 | 97 | 97 | 92 |
| CD4 | - | 73 | 84 | 73 | 84 | 95 |
| CD8 | + | 97 | 96 | 97 | 96 | 96 |
| CD8 | - | 59 | 73 | 59 | 73 | 95 |

Figura 21

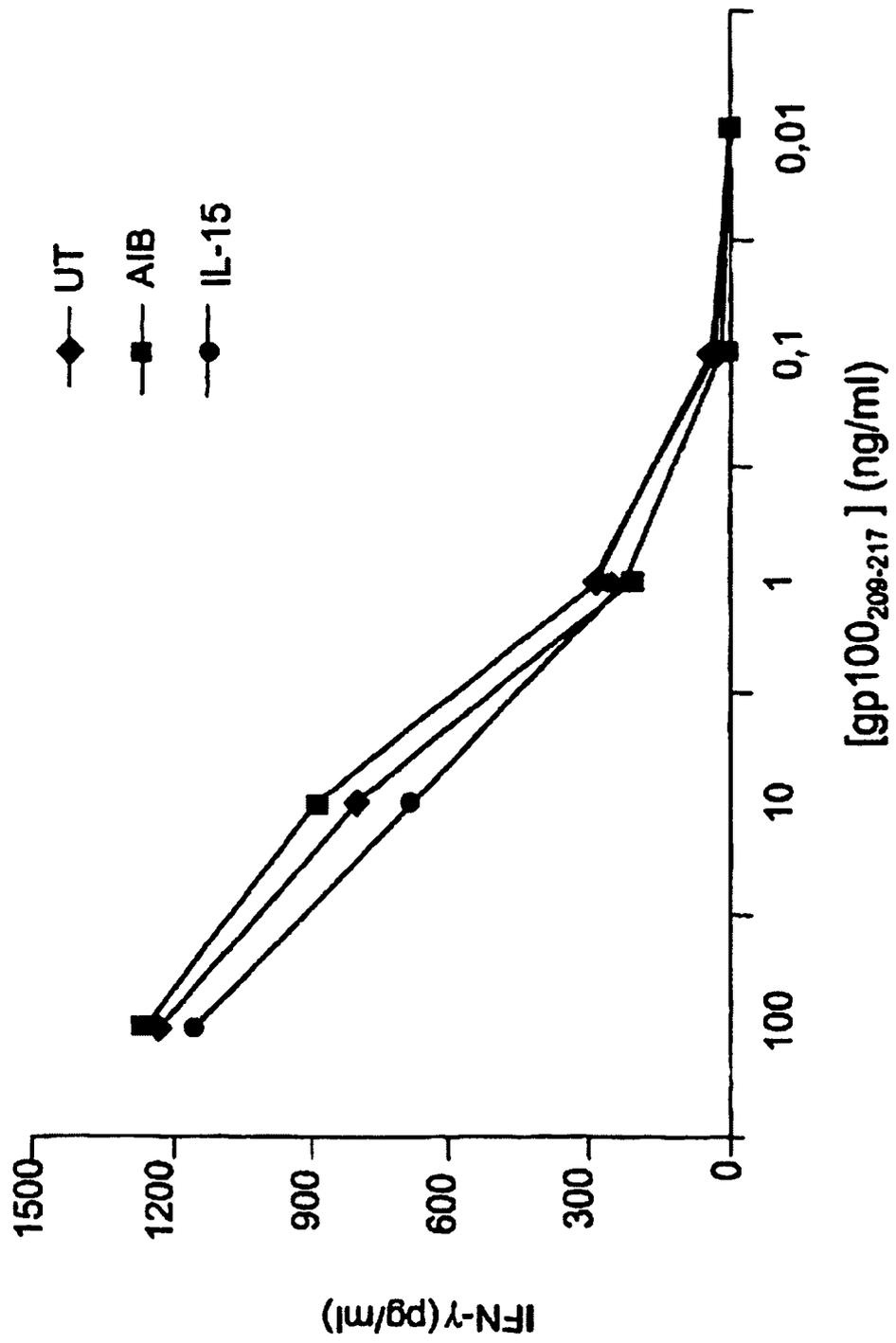


Figura 22

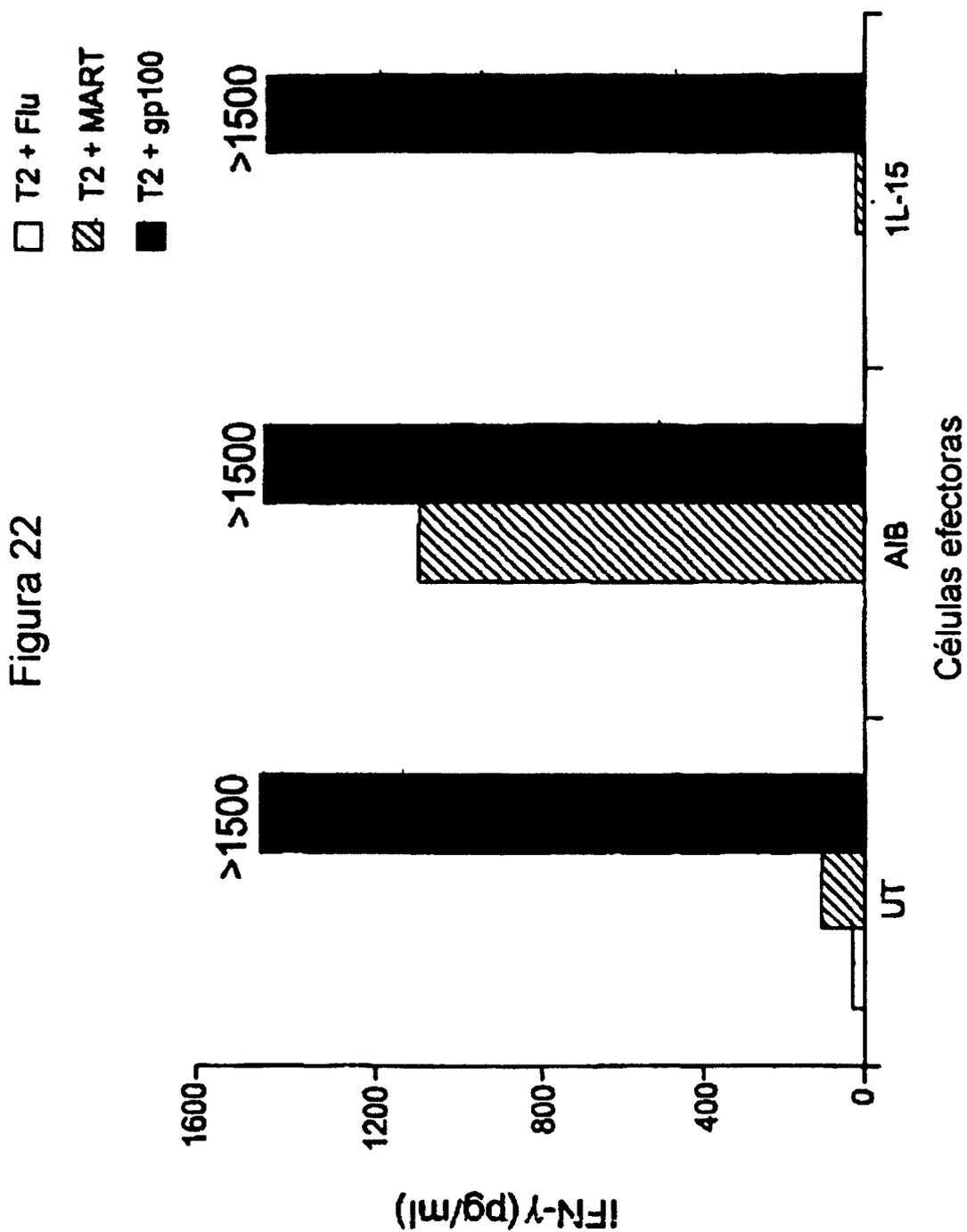
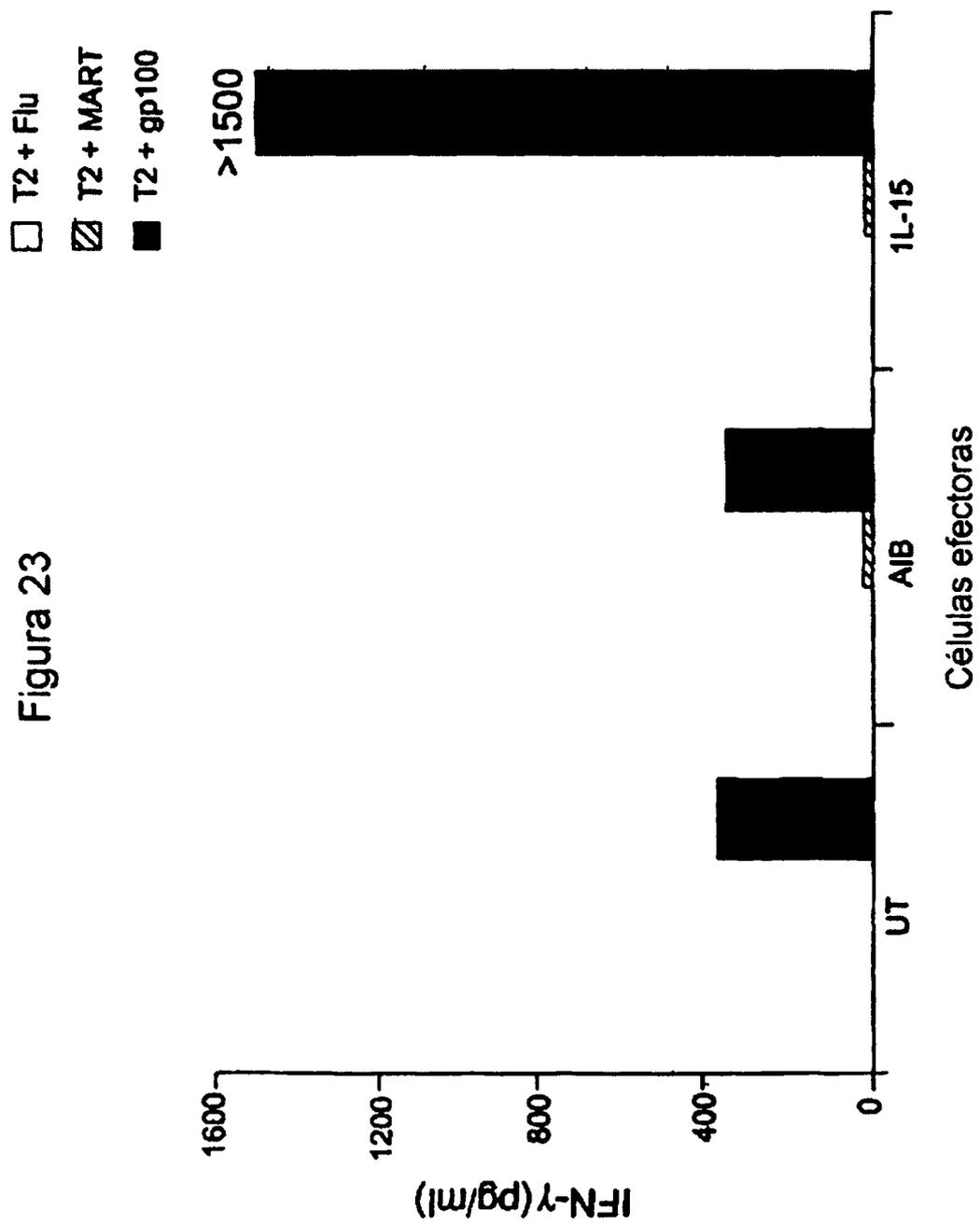


Figura 23



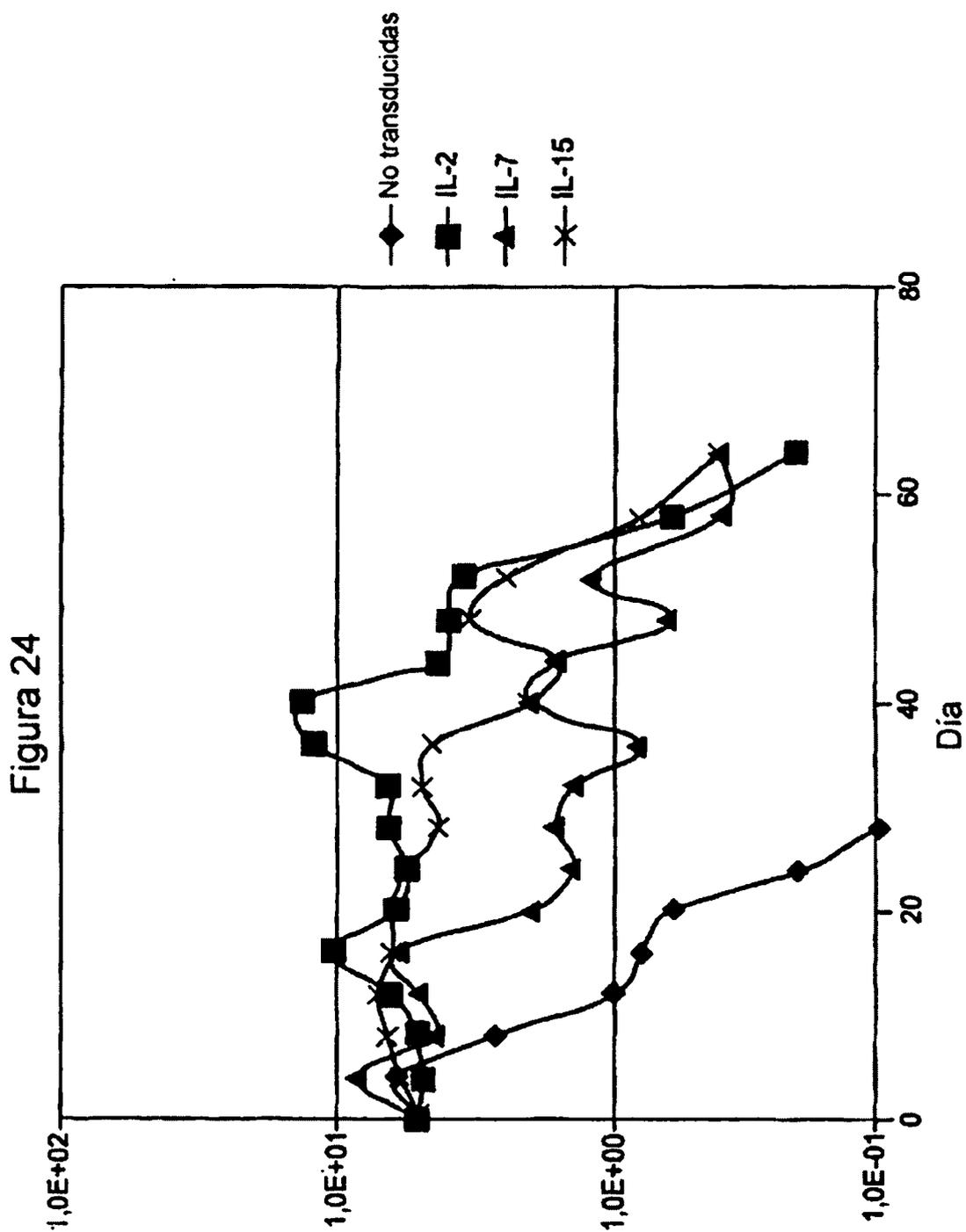


Figura 25

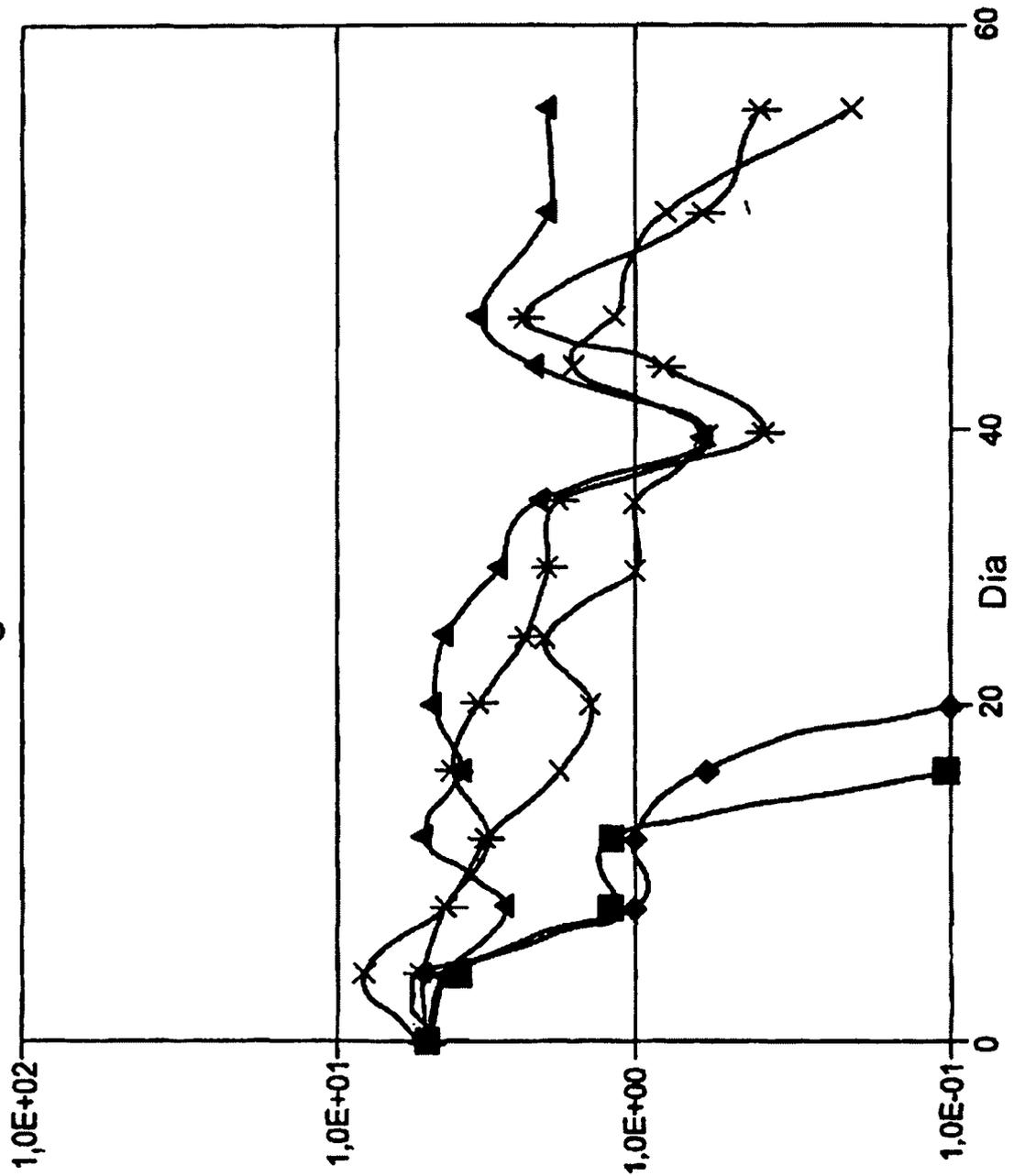


Figura 26

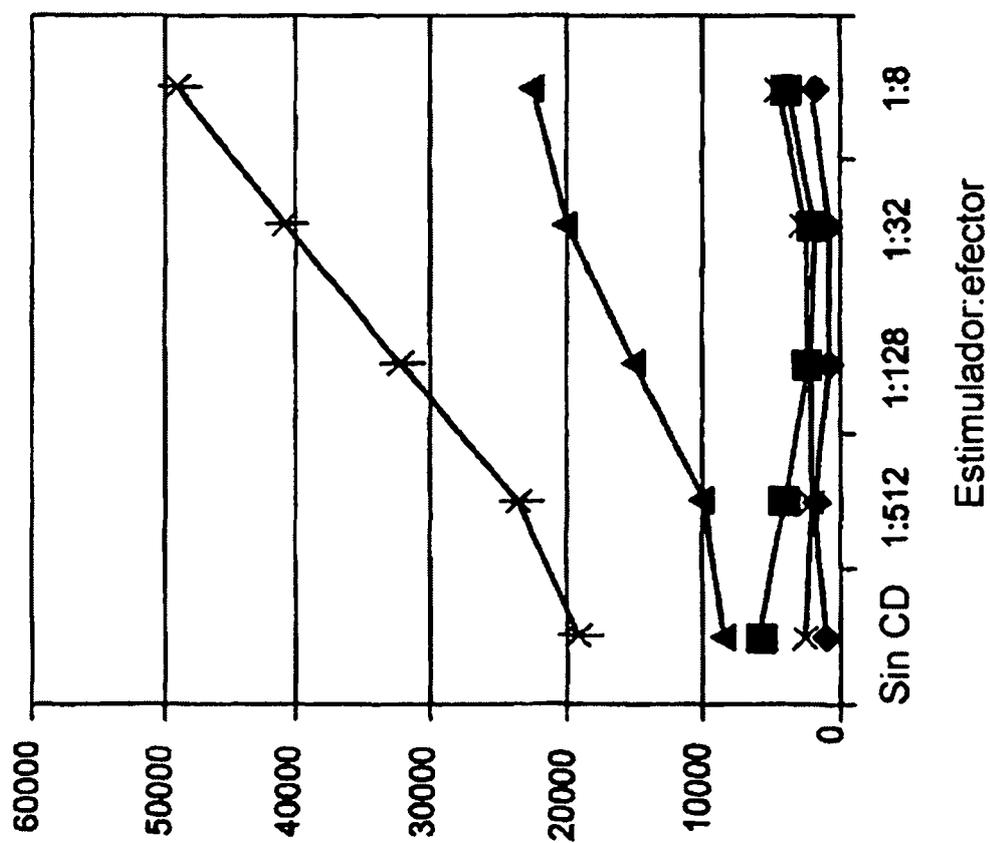


Figura 27

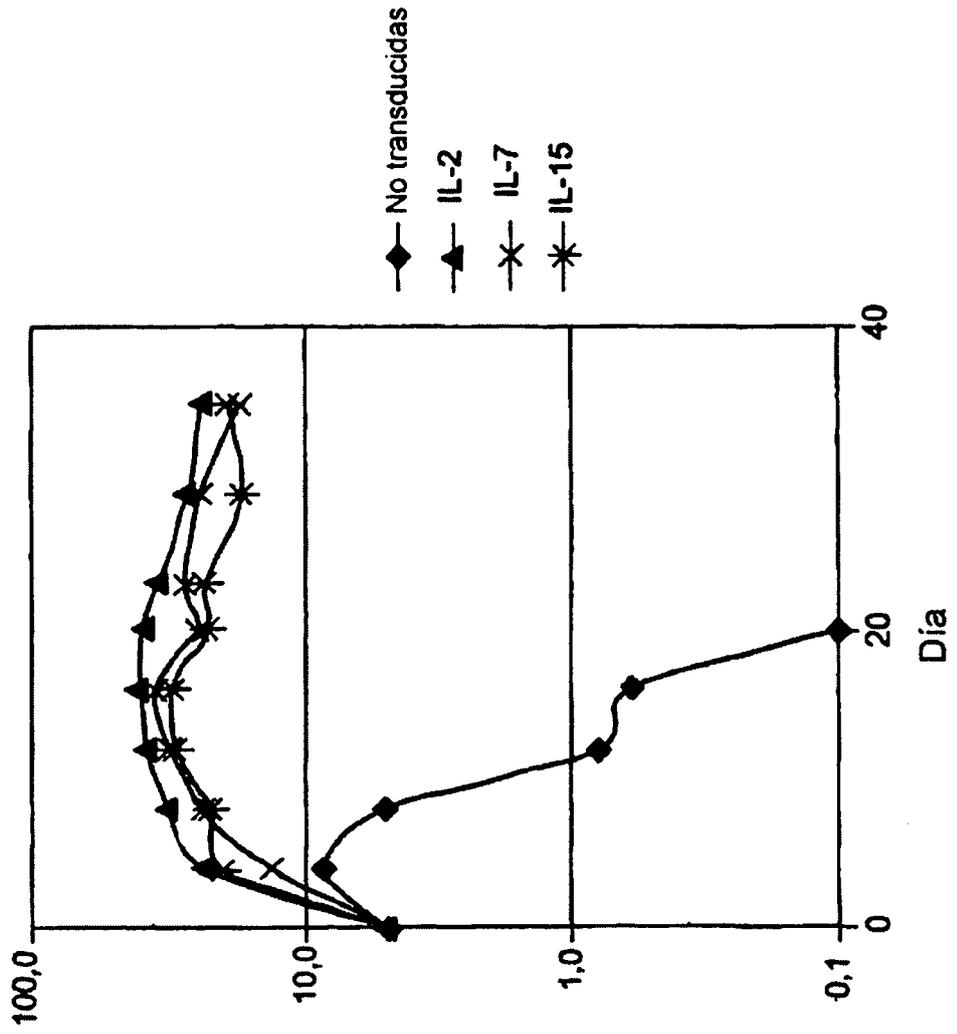


Figura 28

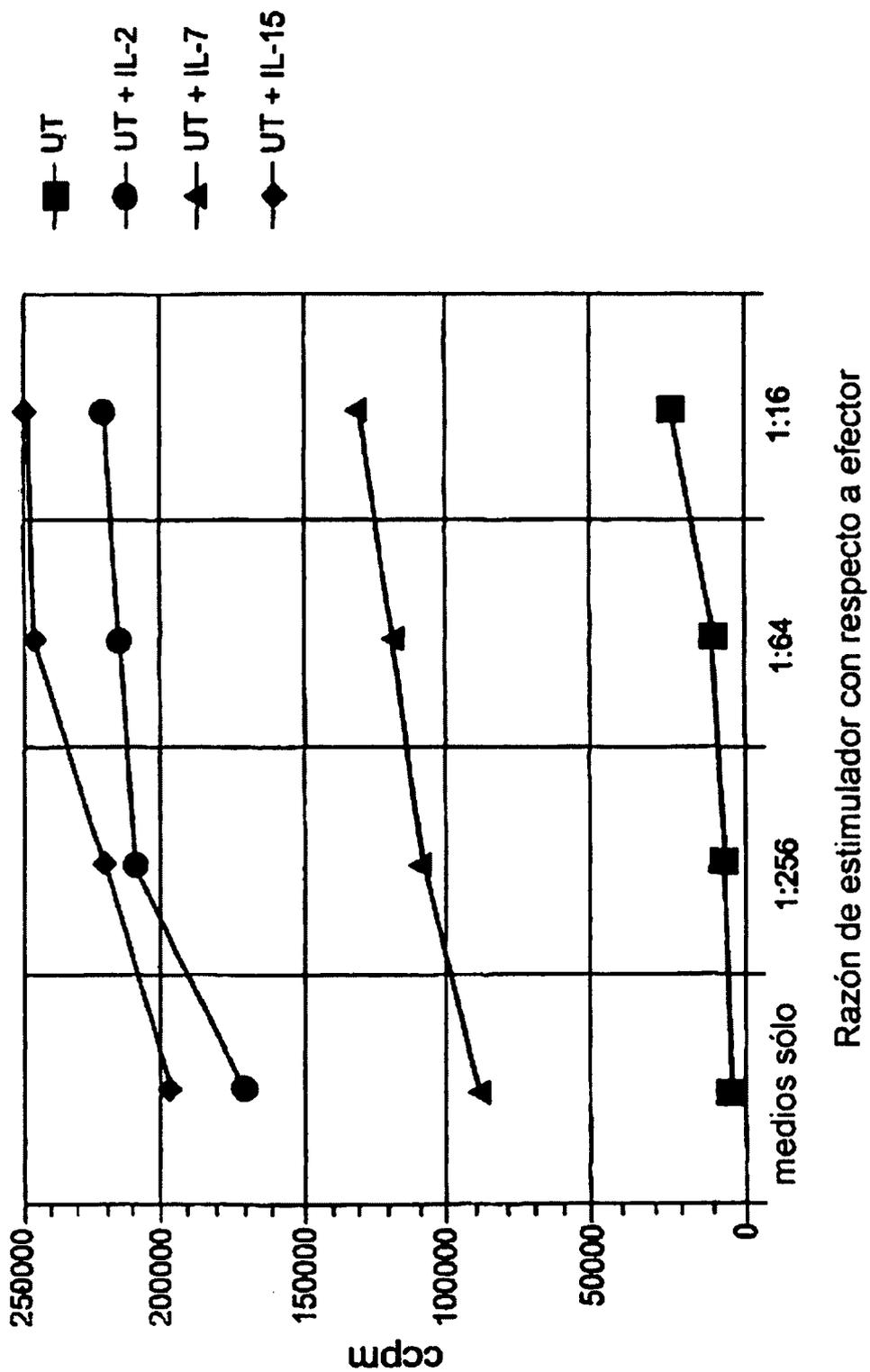
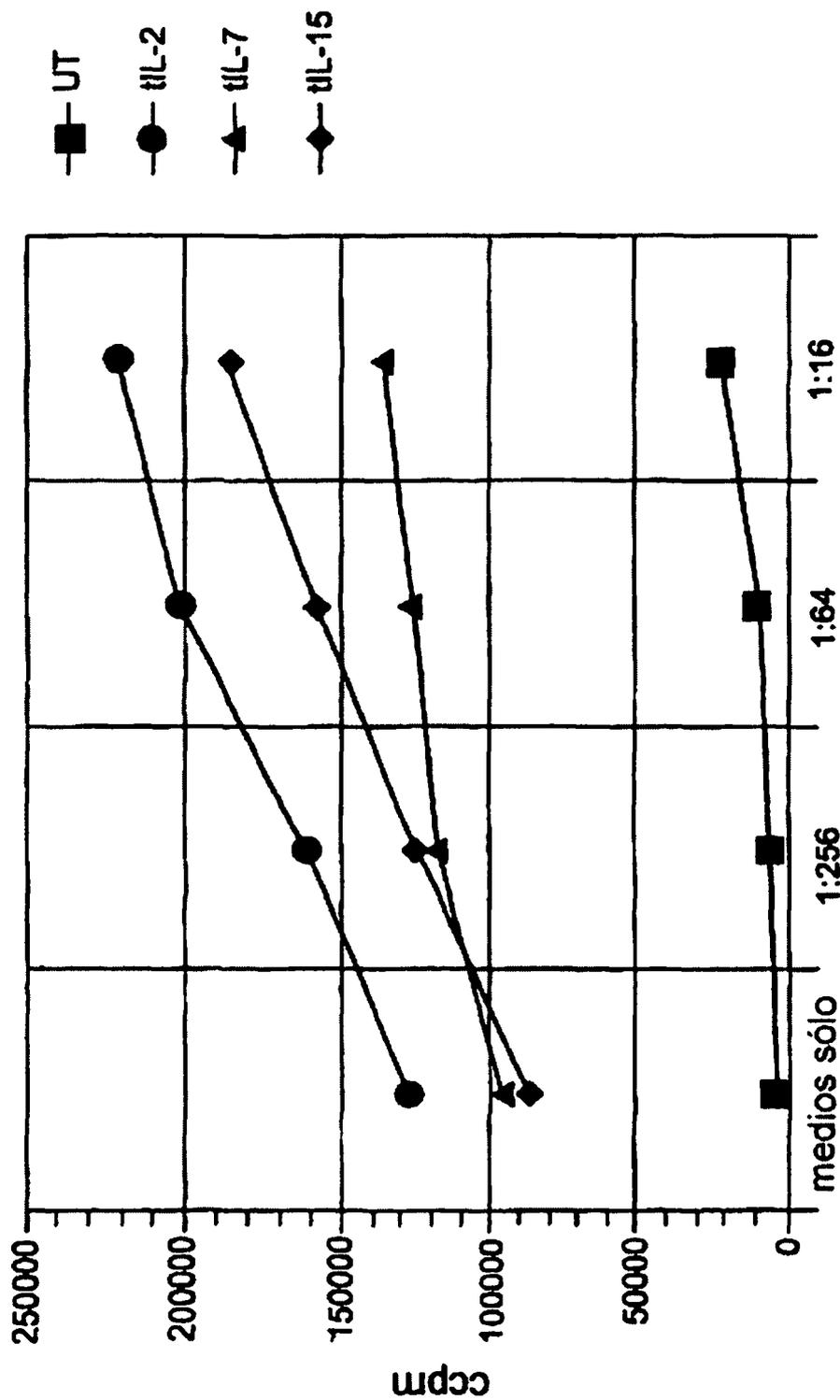


Figura 29



Razón de estimulador con respecto a efector

ES 2 382 775 T3

<400> 2

5 Met Val Leu Gly Thr Ile Asp Leu Cys Ser Cys Phe Ser Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Pro Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys
 20 25 30
 10 Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr
 35 40 45
 Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe
 50 55 60
 15 Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile
 65 70 75 80
 20 His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser
 85 90 95
 Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu
 100 105 110
 25 Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val
 115 120 125
 30 Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
 130 135

<210> 3

35 <211> 344

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> Sintético

<400> 3

45 **gtggtctcca ccacgcgtaa ctgggtgaat gtgatcagcg atctgaagaa gatcgaggat 60**
ctgatccagt ccatgcacat cgatgccacc ctgtataccg agagcgatgt gcaccccagc 120
 50 **tgcaagggtga ccgcatgaa gtgctttctg ctggagctgc aggtgatctc cctggagtcc 180**
ggagatgcca gcatccacga taccgtggag aatctgatca tcctggccaa caacagcctg 240
 55 **tcctccaatg gcaatgtgac cgagtcggga tgcaaggagt gcgaggagct ggaggagaag 300**
aatatcaagg agtttctgca gagctttgta catattgtcc aaat 344

<210> 4

60 <211> 363

<212> ADN

<213> Artificial

65 <220>

<223> Sintético

ES 2 382 775 T3

tttattccgt gctgctcgca agttgaggca atttcttaaa atgaatagca ctggtgaftt 900
 tgatctccac ttattaaaag tttcagaagg cacaacaata ctggtgaact gcaactggcca 960
 5 ggttaaagga agaaaaccag ctgccctggg tgaagcccaa ccaacaaaga gtttggaaaga 1020
 aaataaatct ttaaaggaac agaaaaaact gaatgacttg tgtttcctaa agagactatt 1080
 acaagagata aaaacttggt ggaataaaat tttgatgggc actaaagaac actgaaaaat 1140
 10 atggagtggc aatatagaaa cacgaacttt agctgcatcc tccaagaatc tatctgctta 1200
 tgcagttttt cagagtggaa tgcttcctag aagttactga atgcaccatg gtcaaaacgg 1260
 attagggcat ttgagaaatg catattgtat tactagaaga tgaatacaaa caatggaac 1320
 15 tgaatgctcc agtcaacaaa ctatttctta tatatgtgaa catttatcaa tcagtataat 1380
 tctgtactga tttttgtaag acaatccatg taaggatca gttgcaataa tacttctcaa 1440
 acctgttta atatttcaag acattaaatc tatgaagtat ataatggtt caagattca 1500
 20 aaattgacat tgctttactg tcaaaataat tttatggctc actatgaatc tattatactg 1560
 tattaagagt gaaaattgtc ttcttctgtg ctggagatgt ttagagtta acaatgatat 1620
 atggataatg cccgtgagaa taagagagtc ataaacctta agtaagcaac agcataacaa 1680
 25 ggccaagat acctaaaaga gatttcaaga gatttaatta atcatgaatg tgtaacacag 1740
 tgccttcaat aaatggtata gcaaatggtt tgacatgaaa aaaggacaat ttcaaaaaaa 1800
 taaaataaaa taaaataaaa ttcacctagt ctaaggatgc taaaccttag tactgagtta 1860
 30 cattgtcatt tatatagatt ataacttgtc taaataagtt tgcaatttgg gagatatatt 1920
 ttaagataa taatatatgt ttaccttita attaatgaaa tatctgtatt taattttgac 1980
 actatatctg tatataaaat attttcatac agcattacaa attgcttact ttggaataca 2040
 35 tttctcctt gataaaataa atgagctatg tattaacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2100
 aaaaaaaaaa aaaaaa 2116

40 <210> 6
 <211> 1202
 <212> ADN
 45 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

50 **tgccggcgc cccccgggag ggaactgggt ggccgcaccc tcccggtgc ggtggctgct 60**
gccccccacc ctgcagccag gactcgatgg agaatccatt ccaatatatg gccatgtggc 120
 55 **tctttggagc aatgttccat catgttccat gctgctgctg acgtcacatg gagcacagaa 180**
atcaatgtta gcagatagcc agcccataca agatcgtatt gtattgtagg aggcacgtg 240
gatggatggc tgctggaac cccttgccat agccagctct tcttcaatac ttaaggattt 300
 60 **accgtggctt tgagtaatga gaatttcgaa accacatttg agaagtattt ccatccagtg 360**

65

ES 2 382 775 T3

ctacttgtgt ttacttctaa acagtcattt tctaactgaa gctggcattc atgtcttcat 420
tttgggctgt ttcagtgag ggcttcctaa aacagaagcc aactgggtga atgtaataag 480
 5 **tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat attgatgcta ctttatatac 540**
ggaaagtgat gttcaccca gttgcaaagt aacagcaatg aagtgccttc tcttggagtt 600
 10 **acaagttatt tcacttgagt ccggagatgc aagtattcat gatacagtag aaaatctgat 660**
catcctagca aacaacagtt tgtcttctaa tgggaatgta acagaatctg gatgcaaaga 720
atgtgaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg cagagttttg tacatattgt 780
 15 **ccaaatgttc atcaacactt cttgattgca attgattctt tttaaagtgt ttctgttatt 840**
aacaaacatc actctgctgc ttagacataa caaaacactc ggcatttaaa atgtgctgtc 900
 20 **aaaacaagtt tttctgtcaa gaagatgac agaccttggga tcagatgaac tcttagaaat 960**
gaaggcagaa aatgtcatt gagtaatata gtgactatga acttctctca gacttacttt 1020
actcattttt ttaatttatt attgaaattg tacatatttg tggaataatg taaaatgttg 1080
 25 **aataaaaata tgtacaagtg ttgtttttta agttgcactg atattttacc tcttattgca 1140**
aaatagcatt tgtttaaggg tgatagtcaa attatgtatt ggtggggctg ggtaccaatg 1200
ct 1202

30
 <210> 7
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Sintético
 <400> 7

45 **ggggtggacc atcctctaga 20**

<210> 8
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Sintético
 <400> 8

60 **accgtcgact gcagaattcg 20**

<210> 9
 65 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 382 775 T3

<220>

<223> Sintético

5 <400> 9

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

10

<210> 10

<211> 114

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

20

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

25

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

35

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60

40

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80

45

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95

50

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110

Thr Ser

55

60

65