

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 984**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08842634 .1**
96 Fecha de presentación: **10.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2201103**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **Tratamiento de tumores mediante preparaciones de linfocitos T**

30 Prioridad:
12.10.2007 US 960762 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.11.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE - PARIS 6
(25.0%)
4 PLACE JUSSIEU
75005 PARIS, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(25.0%) y
UNIVERSITE PARIS XII (25.0%)**

72 Inventor/es:
**COHEN, JOSÉ;
KLATZMANN, DAVID;
MAURY, SÉBASTIEN y
LEMOINE, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 389 984 T3

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de tumores mediante preparaciones de linfocitos T

La presente invención se refiere al ámbito de la terapia celular de los cánceres. En particular la invención se refiere al tratamiento de las hemopatías malignas, después de recaída o en primera intención.

5 ESTADO DE LA TÉCNICA TECNOLÓGICO DE LA INVENTION

La eficacia del injerto de células madre hematopoyéticas (CSH) alogénicas para el tratamiento de las hemopatías malignas, incluso las leucemias, se basa a la vez sobre la mieloablación inducida por el acondicionamiento y también sobre la transferencia, en el seno del injerto, de células inmunocompetentes del donante que ejerce un efecto antileucémico. Este efecto se denomina “graft versus leukemia” (GVL) en inglés. La existencia de tal efecto GVL inicialmente fue sugerida por modelos animales y análisis estadísticos retrospectivos efectuados en el hombre que comparaba las tasas de recaída de la leucemia entre los pacientes injertados con un donante alogénico o singénico, entre los que reciben un injerto no manipulado o T-depletado, y entre los que desarrollan, o no, una enfermedad del injerto contra el huésped (GVH) aguda o crónica (Horowitz, et al 1990). Más recientemente, la demostración de un efecto GVL ha sido aportada por la transfusión de leucocitos procedente de la sangre periférica del donante en pacientes en recaída después del injerto de CSH alogénicos. En efecto, en pacientes que presentan una recaída de leucemia mieloide crónica (LMC) después del injerto, se mostró que la inyección de leucocitos procedente del donante inicial (inyección de linfocitos del donante o ILD) podía inducir una nueva remisión, sin necesitar quimioterapia o radioterapia complementaria (Kolb, et al 1990). Esta estrategia se convirtió en un tratamiento de primera intención en estos pacientes y se desarrolló para otras patologías hematológicas recidivantes después del injerto tales como las mielodisplasias, las leucemias agudas linfoblásticas (LAL) y las leucemias agudas mieloblásticas (LAM), algunos linfomas, o los mielomas. Inicialmente utilizada después del injerto con un donante familiar HLA geno-idéntico, el ILD también se utiliza hoy en el marco de los injertos con un donante voluntario de CSH no emparentados (Porter, et al 2000; Dazzi, et al 2000a).

En pacientes en recaída después del injerto, para los cuales hay poca alternativa, y cuyo pronóstico es severo, el ILD constituye una opción terapéutica aceptable, a la cual se puede sin embargo esperar aportar mejoras.

Anteriormente, se desarrollaron varias estrategias con el fin de ampliar la respuesta antitumoral después de ILD.

La primera, desarrollada por el equipo de S. Slavin, tenía por objeto estimular los Linfocitos T del donante bien sea *in vitro* antes de la inyección o bien a la vez *in vitro* y también *in vivo* después de la inyección, por la interleucina 2 (IL-2) recombinante humana (Slavin, et al, 1996). Se reserva tal inyección de Linfocitos T del donante “activados” a pacientes que no responden a una inyección de Linfocitos T del donante fresco. Así, en 5 pacientes en situación de recaída citológica de la hemopatía maligna, la inyección de Linfocitos T activados permitió obtener una remisión completa de la hemopatía que no se había obtenido después de inyección de Linfocitos T del donante fresco. En este estudio, es sin embargo difícil asignar la eficacia de la segunda inyección a la activación de los Linfocitos T en la medida en que puede existir un efecto acumulativo beneficioso de las inyecciones de Linfocitos T del donante, incluso en estado fresco (Dazzi et al, 2000b). Es necesario también tener en cuenta que desde el año 1996, esta estrategia de activación de los Linfocitos T por el IL-2 no fue objeto de publicaciones que venían a confirmar su eficacia. Por lo tanto, su utilización no conoció desarrollo en una amplia escala.

Otra estrategia en curso de desarrollo contempla mejorar la presentación de los antígenos tumorales por las células leucémicas y volverlos así más sensible al efecto GVL. Se basa en datos obtenidos *in vitro* sobre células de leucemias mieloides, que se pueden diferenciar en células dendríticas con la ayuda de citoquinas tales como la interleucina 4 o el granulocito monocito colony stimulating factor (GM-CSF) (Brouwer, et al 2000; Chen, et al, 2000). La utilización de GM-CSF *in vivo* se prevé así durante el período que rodea la inyección de linfocitos T del donante con el fin de ampliar el efecto GVL esperado (Kolb, et al, 2004).

Otra estrategia, propuesta por Miller et al, 2007 consiste en un acondicionamiento del paciente por una quimioterapia linfopenia, antes de un ILD. Este acondicionamiento condujo a una expansión de los linfocitos con una mayor activación inmunitaria.

Por su parte, Powell et al intentaron administrar linfocitos autólogos depletados en linfocitos T reguladores a pacientes afectados por un melanoma (Powell et al, 2007).

RESUMEN DE LA INVENTION

Los inventores proponen ahora efectuar una inyección de linfocitos T del donante, combinado con un acondicionamiento linfopenia, mieloablativo o no, del paciente, con el fin de aumentar el efecto antileucémico de los linfocitos inyectados.

Más concretamente el objeto de la invención es la utilización de linfocitos T, depletados en linfocitos T reguladores, y que expresan una molécula que permite su destrucción específica, para la preparación de una composición destinada a tratar un tumor en un paciente, siendo la composición destinada a ser administrada al paciente después

de un tratamiento linfopenia, mieloablatoivo o no, preferentemente no mieloablatoivo.

También se describe un método para tratar un tumor, el método que incluye:

- el acondicionamiento del paciente por un tratamiento linfopenia, preferentemente no mieloablatoivo;
- la inyección al paciente de linfocitos T, que han sido previamente depletados en linfocitos T reguladores, y expresan una molécula que permite su destrucción específica.

Este procedimiento permite disminuir el rechazo inmunitario contra los linfocitos T, aumentar el efecto antileucémico de los linfocitos T inyectados, e inyectar linfocitos T procedentes de un fondo genético diferente del primer donante y del receptor.

También se describe un método para tratar un tumor en primera intención, el método que incluye:

- el acondicionamiento del paciente por un tratamiento linfopenia, mieloablatoivo o no;
- la inyección al paciente de células madre hematopoyéticas depletadas en linfocitos T; y
- la inyección al paciente de linfocitos T, que han sido previamente depletados en linfocitos T reguladores, y expresan una molécula que permite su destrucción específica.

Según los casos, se pueden en efecto utilizar linfocitos T autólogos o alogénicos, tal como se describe en detalle a continuación.

DESCRIPCIÓN ENUMERADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Los linfocitos T están “depletados” en linfocitos T reguladores, a saber que la preparación de linfocitos T administrada al paciente no comprende prácticamente más que linfocitos T reguladores. Preferentemente, comprende menos de un 10% de la fracción de los linfocitos T reguladores antes de la depleción, preferentemente también menos de 1% de la fracción de los linfocitos T reguladores antes de la depleción.

Los linfocitos T expresan una “molécula que permite su destrucción específica”. Se puede tratar de una molécula codificada por un transgén o una molécula expresada naturalmente por los linfocitos T, cuando éstos son alogénicos. El término “destrucción específica” significa que solamente los linfocitos T administrados al paciente se destruirán, para impedir el desarrollo de una reacción de GVH.

La “molécula que permite su destrucción específica” puede ser por ejemplo un antígeno del sistema HLA, las moléculas Thy-1, receptor NGF o una forma truncada del receptor, o también un antígeno no inmunogénico y no expresado naturalmente por los linfocitos T. Los linfocitos T que llevan una u otra de estas moléculas pueden entonces ser destruidos específicamente por un suero antilinfocitario, o anticuerpos dirigidos específicamente contra dichos antígenos.

La “molécula que permite la destrucción específica” de los linfocitos T puede también ser una molécula codificada por un “gen suicida”.

El término “gen suicida” se refiere a un gen codificador para una molécula tóxica para la célula que lo expresa, de manera condicional.

Los linfocitos T pueden ser útiles para tratar al paciente después de un aloinjerto de células madres hematopoyéticas, en particular en el caso de recaída.

El término “recaída” significa que el tumor, que había mostrado una regresión o un estancamiento, reanudó su desarrollo o, cuando proceda, tiene metástasis.

Los linfocitos T se pueden también administrar en primera intención, es decir, para tratar de los tumores que no se cuidaron antes en el paciente por un injerto de células madre hematopoyéticas,

Fuentes de los linfocitos T

El donante es preferentemente humano, y puede ser un feto, un recién nacido, un niño o un adulto.

Las preparaciones de linfocitos T se obtienen por ejemplo de sangre periférica, del producto sanguíneo de una linfoferesis, de ganglios linfáticos periféricos, del bazo, del timo, de sangre de cordón, etc.

Antes de ser administrados al paciente, los linfocitos T se pueden manipular *ex vivo* de manera a expresar una molécula que permite su destrucción específica, después de la eliminación de los linfocitos T reguladores.

Preferentemente los linfocitos Treg se eliminan antes de la introducción transducción de un gen codificador para la molécula que permite la destrucción específica de los linfocitos T.

- 5 En el caso de un tratamiento de un paciente que haya ya recibido un injerto de células madres hematopoyéticas, los linfocitos T proceden preferentemente del primer donante de células madres hematopoyéticas. Pero es también posible que linfocitos T no procedan ni del donante ni del receptor del injerto de células madre hematopoyéticas.

Depleción en linfocitos T reguladores (Treg):

En el año 1995, el grupo de Shimon Sakaguchi en Japón identificó los linfocitos Treg como constituyente de una subpoblación de linfocitos T CD4+, que representan alrededor de 5% de ellos, y se caracterizan por una expresión fuerte y constitutiva del marcador CD25, que es el receptor del IL-2 (Sakaguchi, et al, 1995).

- 10 Datos más recientes ponen de manifiesto que los Treg humanos reprimen la expresión del CD 127, que es el receptor de IL-7 (Seddiki et al, 2006a). También, se puso de manifiesto que los Treg tenían un fenotipo de células ingenuas CD45RA+ (Seddiki et al, 2006b).

De manera ventajosa, la depleción en linfocitos T reguladores se realiza *ex vivo* por selección negativa de las células CD25+ o selección positiva de las células CD127+.

- 15 La eliminación de las células Treg se puede realizar utilizando técnicas de separación por afinidad, en particular, la separación magnética, utilizando bolas magnéticas cubiertas de anticuerpo, la cromatografía por afinidad, de los agentes citotóxicos vinculados a un anticuerpo monoclonal o utilizados en combinación con un anticuerpo monoclonal. Las técnicas de separación pueden utilizar por ejemplo clasificadores de células activas por fluorescencia.

- 20 Los reactivos de afinidad pueden ser receptores específicos o ligandos de los marcadores indicados más arriba. Preferentemente se trata de anticuerpos, que se pueden combinar por ejemplo con bolas magnéticas, con biotina, o con fluorocromos. Se presentan algunos detalles sobre las técnicas posibles de separación en la solicitud de patente de EE.UU. nº 2006/0063256.

- 25 Como en Attia et al, 2006, que elimina los linfocitos T reguladores sobre la base de su expresión del CD25 para aumentar el efecto antitumoral de una inyección de linfocitos T en el caso de cánceres sólidos, se puede en primer lugar separar las células CD4+, luego entre éstas las células CD25+.

- 30 En un modo de realización particular, los donantes sufren una citaféris que corresponde a dos-tres masas sanguíneas que utilizan preferentemente una máquina Cobe Spectra. Esta técnica de extracción permite obtener por término medio 1 a 2 x10¹⁰ células mononucleadas que contienen 20 a 30% de monocitos, 70 a 80% de linfocitos T, B y células NK. A continuación las células son desplaquetadas y lavadas en circuito cerrado sobre máquina COBE 2991 que permite así recoger una población celular que contiene al menos 5x10⁹ linfocitos T.

- 35 La estrategia de depleción de los linfocitos Treg se realiza a partir de células procedentes bien sea de producto fresco de citaféris o bien de producto congelado de citaféris, en particular, cuando los donantes no pueden ser extraídos en uno de los centros implicados en el ensayo. La depleción de los Linfocitos Treg se basa en la eliminación de células CD25-positivas. Para eso se utiliza un equipo de separación celular en circuito cerrado Miltényi. En resumen, las células frescas o descongeladas se marcan con un anticuerpo monoclonal anti-CD25 directamente acoplado a bolas magnéticas. Las células son depositadas a continuación sobre columna de purificación y separadas por el aparato CliniMACS. La fracción positiva se enriquece en células CD25, la fracción negativa depletada en células CD25. Este procedimiento permite depletar a más de 95% las células CD25+ conservando al mismo tiempo una población celular que contiene más de 2x10⁹ linfocitos T.

Mientras que se destina una fracción de las células a los ensayos de control de calidad, a la constitución de un banco de células, la mayoría de las células se vuelve a poner en cultivo para ser transducidas, amplificadas en cultivo y seleccionadas antes de ser condicionadas en bolsas de tal modo que se inyecte a los pacientes.

Transducción de moléculas que permiten la destrucción específica de los linfocitos T:

- 45 En un modo de realización particular, los linfocitos T se modifican de tal manera para expresar un transgén codificador para una molécula que permite la destrucción específica de dichos linfocitos T.

- 50 De manera preferente, el transgén es un gen "suicida". Por ejemplo se puede tratar de un gen codificador para una molécula apta para fosforilar un análogo de nucleósido en una molécula monofosfatada, por sí mismo convertible por enzimas celulares en nucleótido trifosfatado incorporable en ácidos nucleicos en curso de alargamiento bajo el efecto de las polimerasas con el efecto de la interrupción de alargamiento de las cadenas. Dicho análogo de nucleósido puede ser por ejemplo el aciclovir o el ganciclovir. Dicha molécula expresada por el gen "suicida" puede ser, en particular, la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simplex de tipo 1.

La timidina quinasa del virus del herpes simplex 1 (HSV1-TK), es apta, cuando está presente en una concentración

5 suficiente en las células en cuestión, para fosforilar los análogos de nucleósidos, tal como el aciclovir (9-t-(2-hidroxietoxi)-metil]-guanina) o el ganciclovir (9-[1,3-1Ohidroxi-2-propoximetil]-guanina), en moléculas monofosfatadas, ellas mismas convertibles por enzimas celulares en nucleótidos trifosfatados incorporables en ácidos nucleicos en curso de alargamiento bajo el efecto de las polimerasas en el seno de dichas células, con el efecto de la interrupción de alargamiento de cadenas y la muerte celular que se siga.

En caso de GVH, se administra entonces al paciente el análogo de nucleósido (por ejemplo el ganciclovir).

10 Se puede recurrir a cualquier técnica adecuada para transferir el transgén, en particular, por infección "*in vitro*" de las células correspondientes por una pseudopartícula viral de tipo Moloney anfótropo. Estas partículas virales se producen por una raza celular denominada de "packaging" que se habrá construido de antemano. Una raza de packaging es capaz de fabricar todos los elementos estructurales que constituyen una partícula viral, pero es incapaz de introducir en partículas virales en vías de maduración los ARNs virales producidos por esta raza celular. Esta es la razón por la que, estas razas denominadas de packaging fabrican permanentemente partículas virales vacías.

15 La introducción de una construcción genética apropiada, que contiene el ADN recombinante tal como se definió más arriba, permite a estas razas de packaging ser introducidas en las partículas virales vacías realizando así pseudopartículas virales. Estas pseudopartículas virales son capaces de infectar distintas células diana, células diana que varían según la raza de packaging que se utilizó al principio. Por ejemplo, si esta raza de packaging se deriva de un virus denominado de Moloney anfótropo, las partículas virales producidas infectan perfectamente las células hematopoyéticas humanas.

20 Las técnicas clásicas para la producción de razas de células transformadas por un vector retroviral (véase por ejemplo Danos et al, 1988 y Markowitz et al, 1988), se pueden transponer a la producción de linfocitos. Así mismo las técnicas de transferencia genética que emplean tales sistemas (Kasid et al, 1990) se pueden aplicar a la transferencia, en el hombre, de las células tal como se definieron más arriba.

25 Según un método particular de realización de la invención, los linfocitos T se pueden modificar genéticamente utilizando un vector retroviral SFCMM-2 codificador para el gen "suicida" de fusión HSV-TK/Neo, según el procedimiento de transducción descrito en Ciceri et al, 2007.

30 Un ejemplo de protocolo de transducción comprende una primera fase de cultivo celular de 1 a 6 días para inducir la activación y la puesta en ciclo de las células luego una segunda fase de infección retroviral de 24 horas. La activación y la puesta en ciclo de los linfocitos se obtiene en 1 a 6 días después de la activación por un anticuerpo anti-CD3 en medio RPMI que contiene 10% de suero humano y 600 UI/ml de interleucina 2 recombinante humana. La víspera de la infección, se renueva el medio de cultivo. La infección propiamente dicha se realiza con sobrenadante que contiene bien sea las partículas retrovirales pseudotipadas con una envoltura procedente del virus de la leucemia de Gibbon (GALV) o de las partículas lentivirales pseudotipadas con una envoltura procedente del virus VSV y que contiene el vector retroviral bicistrónico Thy-1-IRES-HSV1-TK. Después de la infección retroviral, las células se vuelven a poner en cultivo antes de ser seleccionadas.

35 La selección de los linfocitos transducidos se puede efectuar gracias a la presencia del gen reportero Thy-1 que permite seleccionar los linfocitos T transducidos con la ayuda de bolas inmunomagnéticas. Así, los linfocitos T se incuban en presencia de un anticuerpo monoclonal anti Thy-1 directamente acoplado a la biotina. Las células se incuban a continuación con microbolas acopladas a la estreptavidina luego depositadas sobre una columna magnética. Las células transducidas Thy-1 positivas se separan por técnica inmunomagnética. Después de la selección inmunomagnética, se obtiene una población de linfocitos T Thy-1 positivos purificados al menos 90%. Después de la selección, los linfocitos bien sea se inyectan al receptor o bien se congelan a la espera de una utilización posterior.

Validación fenotípica y funcional de las preparaciones celulares:

45 Preferentemente, las preparaciones de linfocitos T se ensayan para verificar su fenotipo. Se describen ejemplos de tales ensayos a continuación.

50 a) Análisis inmunofenotípico: se estudian las poblaciones celulares por citometría en flujo antes y después de la depleción en células CD25, antes y después de la modificación genética, antes y después del cultivo, antes y después de la selección de las células transducidas. Para eso, se utilizan técnicas de doble triple o incluso cuádruple marcados de las células por anticuerpos monoclonales. Los porcentajes de células B, NK y monocitos se determinan con los marcadores CD19, CD14, CD16, CD56, CD45. Las subpoblaciones de linfocitos T se estudian utilizando los marcadores CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, CD62L. El porcentaje de Linfocitos Treg se evalúa sobre el marcador CD25 y sobre el marcador FOXP3 o CD127 o CD45RA solo y en combinación con marcadores

55 b) Análisis funcional: Los linfocitos T se analizan a nivel funcional antes y después de cada una de las etapas de manipulación según dos métodos:

5 - Estímulo alogénico: Las células del donante depletadas o no en Linfocitos Treg se ponen en presencia de células mononucleadas irradiadas del receptor, las células mononucleadas irradiadas procedentes de un voluntario se utilizan como control positivo. La proliferación celular en estas distintas condiciones, evaluada por ensayo de incorporación en timidina tritiadas, permite comparar si la depleción en Linfocitos Treg induce *in vitro* un aumento de la aloreactividad. En estas condiciones de estímulo alogénico, se puede estudiar también por citometría de flujo la secreción intracitoplásmica de citoquinas (IFN-Gamma, IL-2, IL-4, IL-10) por los linfocitos T.

10 - Respuesta a los antígenos de recuerdo: Las células depletadas o no en Linfocitos Treg del donante se cultivan durante 4 días en presencia de células dendríticas autólogas irradiadas cargadas o no con distintos antígenos tales como la toxina tetánica, la tuberculina (PPD) y/o la candidina. Las células dendríticas generadas a partir de los monocitos del donante sirven de células presentadoras. La proliferación linfocitaria T en respuesta a estos antígenos de recuerdo se evalúan por ensayo de incorporación de timidina tritiada. Se puede así apreciarse *in vitro* si las poblaciones depletadas en Linfocitos Treg tienen una mejor capacidad o no para responder a antígenos clásicos de recuerdo.

Paciente

15 El paciente considerado es un humano, cualquiera que sea su edad y su sexo. Cuando el paciente es mayor, no se indica un injerto de células madre hematopoyéticas. Se preferirá entonces administrar los linfocitos T en primera intención.

El paciente es alcanzado por un tumor, en particular de un tumor canceroso. Se puede tratar de un tumor sólido o de una hemopatía maligna.

20 Entre los tumores sólidos, se pueden citar los cánceres de pulmón, de la piel, de riñón, de la vejiga, de hueso, de hígado, de páncreas, de ovarios, de seno, de útero, de próstata, de colon, de colorrectal, de cabeza y de cuello, etc.

Entre las hemopatías malignas, se pueden citar la leucemia aguda, el mielodisplasia, o el síndrome linfoproliferativo (tal como leucemia linfoide crónica, mieloma y linfoma), las mielodisplasias, las leucemias agudas linfoblásticas (LAL) y las leucemias agudas mieloblásticas (LAM), los linfomas, o un mieloma.

25 El paciente puede, en particular, sufrir una recaída tumoral, por ejemplo una recaída de hemopatía maligna.

En un modo de realización particular, el paciente sufrió un aloinjerto de células madre hematopoyéticas. En este caso, los linfocitos T administrados pueden no proceder ni del donante ni del receptor del injerto de células madre hematopoyéticas.

30 Preferentemente el aloinjerto previo al CSH procede de un donante familiar, preferentemente HLA de genotipo idéntico, o de un donante voluntario no emparentado. Se puede tratar de un injerto de acondicionamiento mielo-ablativo o no mielo-ablativo, y puede tener T-depletada o no.

El paciente considerado puede presentar una recaída molecular, citogenética, o citológica de la hemopatía cualquiera que sea la fecha después del injerto.

Los criterios de recaída se definen según la hemopatía tratada.

35 Por ejemplo, para una Leucemia aguda (LAM o LAL) y mielodisplasia:

- persistencia de blastos sanguíneos y/o excesos de blastos medulares (> 5%), y/o
- en caso de enfermedad residual analizable a nivel molecular: ausencia de disminución (de al menos un log) de la señal molecular con respecto al punto pre-ILD, o disminución seguida de un nuevo aumento (de al menos un log con respecto al nadir).

40 - en caso de enfermedad residual analizable a nivel citogenético (clásico o FISH): ausencia de disminución (de al menos un 50%) del número de mitosis que llevan la (las) anomalía(s), o disminución seguida de un nuevo aumento (de al menos un 50% con respecto al nadir).

Para un mieloma:

- Estabilidad o aumento del pico monoclonal con respecto al punto pre-ILD.
- 45 - Mieloma de cadenas ligeras: Estabilidad o aumento de los parámetros evaluables (lesiones óseas, proteinuria, infiltración medular plasmocitaria).
- Ausencia de disminución, disminución seguida de un nuevo aumento, o aparición de un tumor plasmocitario.

Para una leucemia linfoide crónica, de los linfomas:

- Estabilidad o aumento del clon (evaluado por citometría de flujo, biología molecular) con respecto al punto pre-ILD.
- Ausencia de disminución o disminución seguida de un nuevo aumento del síndrome tumoral (evaluado a nivel clínico y/o radiológico) con respecto al punto pre-ILD.

5 Cuando están destinados a ser administrados al paciente en primera intención, los linfocitos T pueden ser autólogos frente al paciente. Expresan entonces un transgén, preferentemente un gen "suicida", que permite su destrucción específica. Los linfocitos T administrados pueden también ser alogénicos. Pueden entonces expresar un transgén que permite su destrucción específica, o pueden ser destruidos por un suero antilinfocitario.

10 Cuando están destinados a ser administrados a un paciente que sufre ya un aloinjerto de células madre hematopoyéticas, los linfocitos T son alogénicas, o proceden de tercero (a saber ni del paciente, ni del donante del primer injerto). Pueden entonces expresar un transgén que permite su destrucción específica, o pueden ser destruidos por un suero anti-linfocitaria.

Acondicionamiento del paciente

Antes de la administración de los linfocitos T, el paciente recibe un tratamiento linfopenia no mieloablativo.

15 Preferentemente el tratamiento linfopenia no mieloablativo se aplica de 2 a 8 días antes de la administración de los linfocitos T.

El paciente puede también recibir un tratamiento linfopenia y mieloablativo en cuyo caso recibe además un injerto de células madre hematopoyéticas más la preparación de linfocitos T

Un estudio de este tipo de tratamiento se presentó en Petersen, 2007.

20 El paciente puede ser irradiado completamente ("total body irradiation", por ejemplo a 2Gy), y/o recibir una quimioterapia a base de ciclofosfamida, fludarabina, y/o endoxan. Por ejemplo Miller et al, 2007, describen un tratamiento linfopenia no mieloablativo, que comprende una inyección IV de ciclofosfamida 50 mg/kg una vez a J-6 y J-5, e inyección de fludarabina 25 mg/m² de J-6 a J-2 (siendo J el día del injerto de los linfocitos T). Powell et al; 2007, describen otro protocolo que comprende la inyección de fludarabina 25 mg/m² durante 5 días y de endoxan 60 mg/kg/día durante 2 días.

Ejemplo de protocolo

Según un modo de realización particular, de la composición que se debe inyectar al paciente que se debe tratar incluye linfocitos T modificados obtenidos por:

- i. linfoferesis del donante;
- 30 ii. eliminación de los linfocitos T reguladores
- iii. transducción de un gen codificador para una molécula que permite la destrucción específica de los linfocitos T,
- iv. luego cultivo de los linfocitos T así modificados durante diez a 21 días.

Más concretamente, el protocolo siguiente se puede aplicar:

35 Hacia J-15, se extraen linfocitos T del donante y se eliminan *ex vivo* los T reguladores.

Luego el mismo día se activa *in vitro* (por ejemplo OKT3/IL-2) durante una duración de algunas horas a 6 días, luego se infectan las células en presencia de un sobrenadante viral (retro o lentiviral) que comprende el gen suicida codificador para la TK y un gen de selección membranaria, por ejemplo Thy.1.

40 Luego se cultivan los linfocitos T hasta la obtención del número de células deseadas (por ejemplo 15 días). Los linfocitos que expresan el gen TK se seleccionarán sobre la base de la expresión del gen Thy-1 utilizado como gen reportero.

A J-6, se administra el tratamiento linfopenia al paciente.

A J0, se inyectan los linfocitos T TK + Treg depletados, en unas dosis comprendidas entre 2.10⁶ y 10⁸ CD3+/kg.

45 En caso de GVH, del ganciclovir se administra cualquiera que sea el momento post inyección linfocitos T del donante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Attia P, Powell DJ Jr, Maker AV, Kreitman RJ, Pastan I, Rosenberg SA.: J Immunother (1997). 2006 Mar- Apr; 29(2): 208-14. Selective élimination of human regulatory T lymphocytes in vitro with the recombinant immunotoxin LMB-2.
- 5 - Brouwer, RE, van der Hoorn, M, Kluin-Nelemans, HC, van Zelderen-Bhola, S, Willemze, R, and Falkenburg, JH. 2000. The generation of dendritic-like cells with increased allostimulatory function from acute myeloid leukemia cells of various FAB subclasses. Hum Immunol. 61: 565-574.
- Ciceri F, Bonini C, Marktel S, Zappone E, Servida P, Bernardi M, Pescarollo A, Bondanza A, Peccatori J, Rossini S, Magnani Z, Salomoni M, Benati C, Ponzoni M, Callegaro L, Corradini P, Bregni M, Traversari C, Bordignon C. 2007
10 Blood. 109 (11): 4698-707. Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation.
- Chen, X, Regn, S, Raffegerst, S, Kolb, HJ, and Roskrow, M. 2000. Interferon alpha in combination with GM-CSF induces the differentiation of leukaemic antigen-presenting cells that have the capacity to stimulate a specific anti-leukaemic cytotoxic T-cell response from patients with chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol. 111: 596-607.
- 15 - Danos, O. and Mulligan R. C. 1988. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6460-6464.
- Dazzi, F, Szydlo, RM, Cross, NC, Craddock, C, Kaeda, J, Kanfer, E, Cwynarski, K, Olavarria, E, Yong, A, Apperley, JF, et al. 2000a. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. Blood. 96: 2712-2716.
- 20 - Dazzi, F, Szydlo, RM, Craddock, C, Cross, NC, Kaeda, J, Chase, A, Olavarria, E, van Rhee, F, Kanfer, E, Apperley, JF, et al. 2000b. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. Blood. 95: 67-71.
- Horowitz, MM, Gale, RP, Sondel, PM, Goldman, JM, Kersey, J, Kolb, HJ, Rimm, AA, Ringden, O, Rozman, C, Truitt, RL, et al. 1990. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood. 75: 555-562.
- 25 - Kasid, A., Morecki, S., Aebersold, P., Cornetta, K., Culver, K., Freeman, S., Director, E. Lotze, M. T., Blaese, R. M. Anderson., W. F., and Rosenberg, S. A. 1990. Human gene transfer: characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man. Proc. Natl. Sci. USA 87, 473-477.
- Kolb, HJ, Mittermuller, J, Clemm, C, Holler, E, Ledderose, G, Brehm, G, Heim, M, and Wilmanns, W. 1990. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood.
30 76: 2462-2465.
- Kolb, HJ, Schmid, C, Barrett, AJ, and Schendel, DJ. 2004. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. Blood. 103: 767-776.
- Miller JS, Weisdorf DJ, Burns LJ, Slungaard A, Wagner JE, Verneris MR, Cooley S, Wangen R, Fautsch SK, Nicklow R, Defor T, Blazar BR. 2007 Blood.110 (7): 2761-3, Lymphodepletion followed by donor lymphocyte infusion (DLI) causes significantly more acute graft-versus-host disease than DLI alone.
35
- Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. 1988. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. Virology 167: 400-406.
- Petersen 2007. Medical Bulletin, 54 :112-39. Alloreactivity of therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies.
- 40 - Porter, DL, Collins, RH, Jr., Hardy, C, Keman, NA, Drobyski, WR, Giral, S, Flowers, ME, Casper, J, Leahey, A, Parker, P, et al. 2000. Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions. Blood. 95: 1214-1221.
- Powell DJ Jr, de Vries CR, Allen T, Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. 2007 Inability to mediate prolonged reduction of regulatory T Cells after transfer of autologous CD25-depleted PBMC and interleukin-2 after lymphodepleting chemotherapy. J Immunother May-Jun; 30 (4): 438-47.
45
- Sakaguchi, S, Sakaguchi, N, Asano, M, Itoh, M, and Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol. 155: 1151-1164.
- 50 - Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. 2006a. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. J Exp Med. Jul 10; 203(7): 1693-700.

- Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, Nanan R, Fazekas de Saint Groth B. 2006b. Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood*. 107 (7): 2830-8.

- Slavin, S, Naparstek, E, Nagler, A, Ackerstein, A, Samuel, S, Kapelushnik, J, Brautbar, C, and Or, R. 1996. Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 87: 2195-2204.

5

REIVINDICACIONES

- 1.- Composición de linfocitos T, depletados en linfocitos T reguladores, y que expresan una molécula que permite su destrucción específica, para una utilización en el tratamiento de un tumor en un paciente, siendo la composición destinada a ser administrada al paciente después de un tratamiento linfopenia.
- 5 2.- Composición según la reivindicación 1, en la cual el tumor es una hemopatía maligna, como una leucemia aguda, una mielodisplasia o un síndrome linfoproliferativo.
- 3.- Composición según la reivindicación 1, en la cual el tumor es un tumor sólido.
- 4.- Composición según la reivindicación 1, en la cual los linfocitos T expresan un gen "suicida" que permite su destrucción específica.
- 10 5.- Composición según la reivindicación 4, en la cual el gen denominado "suicida" codifica para una molécula capaz de reaccionar con un análogo de nucleósido para conducir a la muerte de dichos linfocitos T, siendo dicha molécula codificada por el gen "suicida" preferentemente una molécula apta para fosforilar un análogo de nucleósido en una molécula monofosfatada, ella misma convertible por enzimas celulares en nucleótido trifosfatado incorporable en ácidos nucleicos en curso de alargamiento bajo el efecto de las polimerasas con el efecto de la interrupción de alargamiento de las cadenas.
- 15 6.- Composición según la reivindicación 5, en la cual dicho análogo de nucleósido es el aciclovir o el ganciclovir.
- 7.- Composición según la reivindicación 5, en la cual dicha molécula codificada por el gen "suicida" es la timidina quinasa del virus del herpes simplex de tipo 1.
- 8.- Composición según la reivindicación 1, en la cual el paciente sufre de una recaída cancerosa, después de un aloinjerto de células madre hematopoyéticas.
- 20 9.- Composición según la reivindicación 8, en la cual dichos linfocitos T no proceden ni del donante ni del receptor del aloinjerto de células madre hematopoyéticas.
- 10.- Composición según la reivindicación 1, en la cual los linfocitos T están destinados a ser administrados al paciente en primera intención, no sometiendo a dicho paciente a injerto de células madre hematopoyéticas y en la cual los linfocitos T son preferentemente autólogos frente al paciente y expresan un transgén que permite su destrucción específica.
- 25 11.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la cual los linfocitos T administrados al paciente son linfocitos T alogénicos.
- 12.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la cual la depleción en linfocitos T reguladores se realizan *ex vivo* por selección negativa de las células CD25+ o selección positiva de las células CD127+.
- 30 13.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la cual el tratamiento linfopenia es no mieloablativo y consiste, preferentemente, en una administración de ciclofosfamida, fludarabina y/o endoxan.
- 14.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la cual la composición está destinada a ser administrada de 2 a 8 días después del tratamiento linfopenia no mieloablativo.
- 35 15.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la cual la composición comprende linfocitos T modificados obtenidos por:
- i. linfoferesis del donante;
 - ii. eliminación de los linfocitos T reguladores
 - 40 iii. transducción de un gen codificador para una molécula que permite la destrucción específica de los linfocitos T,
 - iv. luego cultivo de los linfocitos T así modificados durante 10 a 21 días.