

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 760**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 08742463 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2141997**

54 Título: **Expresión constitutiva de ligandos coestimuladores en linfocitos T transferidos de forma adoptiva**

30 Prioridad:

30.03.2007 US 921144 P

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

21.03.2013

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER
CENTER (100.0%)
1275 YORK AVENUE
NEW YORK, NY 10021, US**

72 Inventor/es:

**SADELAIN, MICHEL y
STEPHAN, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 398 760 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

Expresión constitutiva de ligandos coestimuladores en linfocitos T transferidos de forma adoptiva

Referencia cruzada a solicitud relacionada

5 Cada una de las solicitudes y patentes citadas en este texto, así como cada documento o referencia citado en cada una de las solicitudes y patentes (incluyendo durante la prosecución de cada patente expedida; "documentos citados en la solicitud"), y cada una de las solicitudes o patentes de PCT y extranjeras correspondientes a y/o que reivindicán el beneficio de prioridad de cualquiera de estas solicitudes y patentes, y cada uno de los documentos citados o referidos en cada uno de los documentos citados en la solicitud, pueden emplearse en la práctica de la invención.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de próstata es el cáncer más frecuente en hombres en los Estados Unidos y es la causa de casi 31.000 muertes cada año. Cuando se diagnostica pronto, el cáncer puede tratarse eficazmente por cirugía o radiación. La enfermedad residual postquirúrgica requiere radiación y/o terapia hormonal, que puede evitar la progresión tumoral y metástasis. En la actualidad, no existe tratamiento curativo para cáncer de próstata metastásico refractario para hormonas. La inmunoterapia es una terapia dirigida que en principio posibilita el tratamiento de tales cánceres. Siguen existiendo obstáculos para inducir la inmunidad tumoral, lo que requiere la expansión de linfocitos T citotóxicos a números suficientes para mediar en el rechazo de tumores. Entre los mecanismos que limitan la sensibilización de linfocitos T eficaz y el rechazo de tumores está la ausencia inherente de ligandos coestimuladores en muchos tumores malignos.

20 **Sumario de la invención**

La presente divulgación generalmente proporciona células inmunosensibles, incluyendo linfocitos T y linfocitos Citolíticos Naturales (NK), que expresan al menos uno de un receptor que reconoce antígenos y un ligando coestimulador y procedimientos de uso de los mismos para el tratamiento de neoplasia, enfermedad infecciosa y otras patologías.

25 La invención generalmente proporciona un linfocito T que comprende un receptor que se une a un antígeno y ligandos coestimuladores exógenos 4-1BBL y CD80.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un linfocito T específico de virus que expresa un vector (por ejemplo, un vector de expresión) que codifica un polipéptido seleccionado de uno cualquiera o más de CD80 y 4-1BBL. En una realización, el linfocito T específico de virus reconoce un virus seleccionado de uno cualquier o más de citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (VEB), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y antígenos de virus de la gripe.

35 En otro aspecto más, la invención proporciona un linfocito T específico de antígeno tumoral que expresa un vector que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en CD80 y 4-1BBL. En una realización, la célula expresa CD80 y 4-1BBL. En otra realización, el vector es un vector retroviral (por ejemplo, gamma-retroviral o lentiviral); también puede ser no viral.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona un procedimiento para modular una respuesta inmunitaria en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible de cualquier aspecto previo. En una realización, el procedimiento aumenta o reduce una respuesta inmunitaria. En otra realización, el procedimiento aumenta la autotolerancia o aumenta la tolerancia a un trasplante de órgano.

40 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una neoplasia en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno tumoral y un vector que codifica un ligando coestimulador. En una realización, la neoplasia se selecciona de uno cualquier o más de cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama y glioblastoma. En otra realización, el antígeno tumoral es antígeno de membrana específico de próstata, CD19, NY-ESO-1, WT-1, hTERT o mesotelina.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para imponer tolerancia en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno y un vector que codifica un ligando coestimulador. En una realización, el procedimiento previene o reduce una enfermedad autoinmune o una enfermedad asociada con trasplante alogénico.

50 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una infección por patógenos en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno viral y un vector que codifica un ligando coestimulador. En una realización, el patógeno es un virus, una bacteria, un hongo, un protozoo o un parásito. En otra realización, el virus se selecciona de uno cualquiera o más de citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (VEB), Virus de la

Inmunodeficiencia Humana (VIH) y virus de la gripe. En otra realización más, la célula es un linfocito T, un linfocito Citolítico Natural (NK) o un linfocito T citotóxico (CTL).

5 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un procedimiento para producir una célula inmunosensible específica de antígeno, comprendiendo el procedimiento introducir en la célula inmunosensible una secuencia de ácido nucleico que codifique un receptor de antígeno quimérico, en el que el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a antígeno acoplado a un dominio de señalización intracelular que activa una célula inmunosensible. En una realización, la célula inmunosensible es un linfocito T, CTL o linfocito NK. En otra realización, el dominio de unión a antígeno es un dominio de unión a antígeno tumoral. En otra realización más, el antígeno tumoral es antígeno de membrana específico de próstata (PSMA). En otra realización más, el dominio de señalización intracelular activa un linfocito T, linfocito CTL o linfocito NK. En otra realización más, el dominio de señalización intracelular es el dominio de señalización de cadena ξ .

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una neoplasia en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito T que comprende un antígeno tumoral y un complejo presentador de antígenos que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se seleccionan de uno cualquiera o más de un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y combinaciones de los mismos, tratando de este modo cáncer en el sujeto.

15 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una neoplasia en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito Citolítico Natural (NK) que comprende un antígeno tumoral y un complejo presentador de antígenos que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona de uno cualquiera o más de un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y combinaciones de los mismos, tratando de este modo cáncer en el sujeto. En una realización, el ligando de TNF se selecciona de uno cualquiera o más de 4-1BBL, OX40L, CD70, CD30L y LIGHT. En otra realización, el ligando de la superfamilia de Ig se selecciona de CD80 y CD86. En otra realización más, la célula expresa al menos dos ligandos coestimuladores, en los que uno es un ligando de TNF (por ejemplo, 4-1BBL) y el otro es un ligando de la superfamilia de Ig (por ejemplo, CD80).

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito T que comprende un receptor específico para un antígeno viral y un complejo presentador de antígenos que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona de uno cualquiera o más de un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y combinaciones de los mismos, tratando de este modo la enfermedad infecciosa en el sujeto.

25 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un linfocito Citolítico Natural (NK) que comprende un receptor específico para un antígeno viral y un complejo presentador de antígenos que comprende al menos dos ligandos coestimuladores, en el que al menos uno de los dos ligandos coestimuladores se selecciona de uno cualquiera o más de un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF) y un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y combinaciones de los mismos, tratando de este modo la enfermedad infecciosa en el sujeto. En una realización, el sujeto es un sujeto inmunocomprometido. En otra realización, el ligando de TNF se selecciona de uno cualquiera o más de 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L. En otra realización más, el ligando de la superfamilia de Ig se selecciona de uno cualquiera o más CD80 y CD86. En otra realización más, los al menos dos ligandos coestimuladores son un ligando de TNF y un ligando de la superfamilia de Ig. En otra realización, el ligando de TNF es 4-1BBL y el ligando de la superfamilia de Ig es CD80. En otra realización, el complejo de reconocimiento de antígenos se expresa de forma constitutiva en la superficie de la célula. En otra realización, el antígeno viral es un antígeno específico para Citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (VEB), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o virus de la gripe. En otra realización, los al menos dos ligandos coestimuladores se expresan de forma constitutiva en la superficie de la célula.

30 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una célula inmunosensible de cualquier aspecto previo en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de una neoplasia que comprende una cantidad eficaz de un linfocito T específico de antígeno tumoral de cualquier aspecto previo en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de una infección por patógeno que comprende una cantidad eficaz de un linfocito T específico de virus del aspecto previo en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición comprende además una citocina seleccionada de una cualquiera o más de IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL7, IL12, IL15, IL21, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, interferón alfa, beta o gamma y eritropoyetina.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit de acuerdo con la reivindicación 15.

En diversas realizaciones de cualquier aspecto previo, el procedimiento comprende además la etapa de obtener la célula inmunosensible o ligando coestimulador. En otras realizaciones más de los aspectos previos, el ligando coestimulador se expresa de forma constitutiva o inducible. En otras realizaciones más de los aspectos previos, se expresan de forma constitutiva al menos dos ligandos coestimuladores. En diversas realizaciones de cualquier aspecto previo, las células se seleccionan de una cualquiera o más de un linfocito T, un linfocito Citolítico Natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL) y un linfocito T regulador. En otras realizaciones más de los aspectos previos, el antígeno es un antígeno tumoral o patógeno, por ejemplo, uno cualquiera o más de antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), Antígeno Carcinoembrionario (CEA), IL13Ralfa, her-2, CD19, NY-ESO-1, HIV-1 Gag, Lewis Y, Mart-1, gp100, tirosinasa, WT-1, hTERT, mesotelina. En otras realizaciones más de los aspectos previos, la célula expresa un receptor de antígeno recombinante y/o endógeno. En otras realizaciones más de los aspectos previos, el ligando coestimulador es un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF) (por ejemplo, 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L) o un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) (por ejemplo, CD80 y CD86). En otras realizaciones más de los aspectos previos, la célula inmunosensible expresa al menos un ligando de TNF y al menos un ligando de la superfamilia de Ig. En otras realizaciones más de los aspectos previos, la célula expresa 4-1BBL y CD80. En otras realizaciones más de los aspectos previos, se expresan de forma constitutiva o inducible un complejo presentador de antígenos y/o ligandos coestimuladores en la superficie del linfocito T. En otras realizaciones más de los aspectos previos, el ligando coestimulador se expresa en un vector retroviral. En otra realización, el antígeno tumoral es antígeno de membrana específico de de próstata, CD19, NY-ESO-1, WT-1 o hTERT. En otras realizaciones más, la célula expresa un receptor recombinante o uno endógeno para el antígeno. En otras realizaciones más, el ligando coestimulador es un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF) o un ligando de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig). En otras realizaciones más, el ligando de TNF se selecciona de uno cualquiera o más de 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L. En diversas realizaciones, el dominio de señalización intracelular es un dominio de señalización de cadena ζ . En otras realizaciones, una señal coestimuladora se proporciona a través de un receptor de antígenos obtenido por ingeniería genética y la otra sobreexpresando un ligando coestimulador. En otras realizaciones más, el ligando de la superfamilia de Ig se selecciona del grupo que consiste en CD80 y CD86.

Definiciones

Por "polipéptido CD80" se entiende una proteína que tiene al menos el 85 % de identidad con la Referencia de NCBI Nº: NP_005182 o un fragmento de la misma que actúa como un ligando de la superfamilia de Ig.

Por "molécula de ácido nucleico CD80" se entiende cualquier polinucleótido que codifique un polipéptido CD80. Una molécula de ácido nucleico CD80 a modo de ejemplo es NM_005191.

Por "polipéptido 4-1BBL" se entiende una proteína que tiene al menos el 85 % de identidad con la Referencia de NCBI Nº: P41273 o NP_001552 o un fragmento de la misma que actúa como un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF).

Por "molécula de ácido nucleico 4-1BBL" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido 4-1BBL.

Por "polipéptido OX40L" se entiende una proteína que tiene al menos el 85 % de identidad con la Referencia de NCBI Nº: BAB 18304 o NP_003317 o un fragmento de la misma que es un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF).

Por "molécula de ácido nucleico OX40L" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido OX40L.

Por "polipéptido CD70" se entiende una proteína que tiene al menos el 85 % de identidad con la Referencia de NCBI Nº: NP_001243 o un fragmento de la misma que actúa como un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF).

Por "molécula de ácido nucleico CD70" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido CD70.

Por "polipéptido Light" se entiende una proteína que tiene al menos el 85 % de identidad con la Referencia de NCBI Nº: NP_742011 o un fragmento de la misma que actúa como un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF).

Por "molécula de ácido nucleico Light" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido Light.

Por "polipéptido CD30L" se entiende una proteína que tiene al menos el 85 % de identidad con la Referencia de NCBI Nº: AAB97877 o un fragmento de la misma que actúa como un ligando de factor de necrosis tumoral (TNF).

Por "molécula de ácido nucleico CD30L" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido CD30L.

Por "polipéptido CD86" se entiende una proteína que tiene al menos el 85 % de identidad con la Referencia de NCBI Nº: P42081 o un fragmento de la misma que actúa como un ligando de la superfamilia de Ig.

Por "molécula de ácido nucleico CD86" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido CD86.

Por "polipéptido Pzl" se entiende una proteína que tiene al menos el 85 % de identidad con la proteína descrita por Gong y col., Neoplasia 1: 123-7, 1999 o un fragmento de la misma.

5 Por "polipéptido P28z" se entiende una proteína que tiene al menos el 85 % de identidad con la proteína descrita por Maher y col. Nature Biotechnology, Vol 20, Ene 2002, 70-75 o un fragmento de la misma. El dominio de señalización de cadena ξ también se describe por Maher y col. Nature Biotechnology, Vol 20, Ene 2002, 70-75.

10 Las moléculas de ácido nucleico útiles en los procedimientos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo. No es necesario que tales moléculas de ácido nucleico sean al 100 % idénticas con una secuencia de ácido nucleico endógena pero normalmente mostrarán identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen "identidad sustancial" con una secuencia endógena son normalmente capaces de hibridar con al menos una hebra de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Por "hibridar" se entiende emparejarse para formar una molécula bicatenaria entre secuencias polinucleotídicas complementarias (por ejemplo, un gen descrito en el presente documento), o partes de la misma, en diversas condiciones de rigurosidad. (Véase, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152: 399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152: 507).

15 Por ejemplo, la concentración salina rigurosa será habitualmente menor de aproximadamente NaCl 750 mM y citrato trisódico 75 mM, preferentemente menor de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato trisódico 50 mM, y más preferentemente menor de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato trisódico 25 mM. Puede obtenerse hibridación de baja rigurosidad en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que puede obtenerse hibridación de alta rigurosidad en presencia de al menos aproximadamente el 35 % de formamida y más preferentemente al menos aproximadamente el 50 % de formamida. Las condiciones de temperatura rigurosas incluirán habitualmente temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 37 °C y más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C. Se conocen bien por los expertos en la materia diversos parámetros adicionales, tales como tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecil sulfato sódico (SDS), y la inclusión o exclusión de ADN vehículo. Se consiguen diversos niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según sea necesario. En una realización preferida, la hibridación se producirá a 30 °C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM y SDS 1 %. En una realización más preferida, la hibridación se producirá a 37 °C en NaCl 500 mM, citrato trisódico 50 mM, SDS 1 %, formamida 35 % y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 μ g/ml (ADNmc). En una realización más preferida, la hibridación se producirá a 42 °C, en NaCl 250 mM, citrato trisódico 25 mM, SDS 1 %, formamida 50 % y ADNmc 200 μ g/ml. Resultarán evidentes para los expertos en la materia variaciones útiles en estas condiciones.

20 Para la mayoría de las aplicaciones, las etapas de lavado después de hibridación también varían en rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad del lavado pueden definirse por concentración salina y por temperatura. Como anteriormente, la rigurosidad del lavado puede aumentarse reduciendo la concentración salina o aumentando la temperatura. Por ejemplo, la concentración salina rigurosa para las etapas de lavado preferentemente será menor de aproximadamente NaCl 30 mM y citrato trisódico 3 mM y más preferentemente menor de NaCl 15 mM y citrato trisódico 1,5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado incluirán habitualmente una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C y aún más preferentemente de al menos aproximadamente 68 °C. En una realización preferida, las etapas de lavado se producirán a 25 °C en NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM y SDS 0,1 %. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 42 °C, en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM y SDS 0,1 %. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 68 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM y SDS 0,1 %. Resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la materia variaciones adicionales de estas condiciones. Se conocen bien por los expertos en la materia técnicas de hibridación y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (Science 196: 180, 1977); Grunstein y Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72: 3961, 1975); Ausubel y col. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

25 Por "sustancialmente idéntico" se entiende un polipéptido o molécula de ácido nucleico que muestra al menos el 50 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo una cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento) o secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento). Preferentemente, dicha secuencia es al menos el 60 %, más preferentemente el 80 % o el 85 %, y más preferentemente el 90 %, el 95 % o incluso el 99 % idéntica al nivel de aminoácidos o ácido nucleico con la secuencia usada para comparación.

30 La identidad de secuencia se mide normalmente usando software de análisis de secuencia (por ejemplo, Patente de Software de Análisis de Secuencia del Grupo de Informática Genética, Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP, o PILEUP/PRETTYBOX). Dicho software empareja secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservativas normalmente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque a modo de ejemplo para determinar el grado de identidad, puede usarse un programa BLAST, indicando una puntuación de

probabilidad entre e-3 y e-100 una secuencia cercanamente relacionada.

Por "análogo" se entiende una molécula de ácido nucleico o polipéptido relacionada estructuralmente que tiene la función de una molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia.

5 El término "ligando" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que se une a un receptor. En particular, el ligando se une a un receptor en otra célula, permitiendo el reconocimiento entre células.

La expresión "expresión constitutiva" como se usa en el presente documento se refiere a expresión en todas las condiciones fisiológicas.

10 La expresión "receptor de antígeno quimérico" (CAR) como se usa en el presente documento se refiere a un dominio de unión a antígeno tumoral que se fusiona con un dominio de señalización intracelular capaz de activar linfocitos T. Más habitualmente, el dominio de unión extracelular de CAR deriva de un anticuerpo monoclonal murino o humanizado.

Por "enfermedad" se entiende cualquier afección o trastorno que dañe o interfiera con la función normal de una célula, tejido u órgano. Los ejemplos de enfermedades incluyen neoplasia o infección por patógenos de una célula.

15 Por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad suficiente para detener, aliviar o inhibir la proliferación continuada, crecimiento o metástasis (por ejemplo, invasión o migración) de una neoplasia.

Por "imponer tolerancia" se entiende prevenir la actividad de células autorreactivas o inmunosensibles que se dirigen a órganos o tejidos trasplantados.

20 Por "exógeno" se entiende una molécula de ácido nucleico o polipéptido que no está presente de forma endógena en la célula, o no está presente a un nivel suficiente para conseguir los efectos funcionales obtenidos cuando se sobreexpresa. El término "exógeno" abarcaría por lo tanto cualquier molécula de ácido nucleico recombinante o polipéptido expresado en una célula, tal como polipéptidos y moléculas de ácido nucleico ajenos, heterólogos y sobreexpresados.

25 Por un "polipéptido o molécula de ácido nucleico heterólogo" se entiende una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADNc, ADN o ARN) o polipéptido que no está normalmente presente en una célula o muestra obtenida de una célula. Este ácido nucleico puede ser de otro organismo o puede ser, por ejemplo, una molécula de ARNm que no se expresa normalmente en una célula o muestra.

Por "célula inmunosensible" se entiende una célula que actúa en una respuesta inmunitaria o un progenitor o descendencia de la misma.

30 Por "célula aislada" se entiende una célula que está separada de los componentes moleculares y/o celulares que acompañan de forma natural a la célula.

La expresión "dominio de unión a antígeno tumoral" como se usa en el presente documento se refiere a un dominio capaz de unirse específicamente a un determinante antigénico particular o conjunto de determinantes antigénicos presentes en un tumor.

35 El término "obtener" como en "obtener el agente" pretende incluir comprar, sintetizar o adquirir de otro modo el agente (o sustancia o material indicado).

Por "modular" se entiende alterar de forma positiva o negativa. Las modulaciones a modo de ejemplo incluyen un cambio del 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 %.

40 Por "neoplasia" se entiende una enfermedad caracterizada por la proliferación patológica de una célula o tejido y su posterior migración a o invasión de otros tejidos u órganos. El crecimiento neoplásico es normalmente incontrolado y progresivo, y se produce en condiciones que no inducirían o provocarían cese de la multiplicación de células normales. Las neoplasias pueden afectar a una diversidad de tipos celulares, tejidos u órganos, incluyendo pero sin limitación a un órgano seleccionado del grupo que consiste en vejiga, hueso, cerebro, mama, cartílago, glía, esófago, trompas de Falopio, vesícula biliar, corazón, intestinos, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, tejido nervioso, ovarios, páncreas, próstata, músculo esquelético, piel, médula espinal, bazo, estómago, testículos, timo, 45 tiroides, tráquea, tracto urogenital, uréter, uretra, útero y vagina, o un tejido o tipo celular de los mismos. Las neoplasias incluyen cánceres, tales como sarcomas, carcinomas o plasmacitomas (tumor maligno de las células plasmáticas). Las neoplasias ilustrativas para las que puede usarse la invención incluyen, pero sin limitación leucemias (por ejemplo, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, 50 eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin), macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, y tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rbdomiosarcoma, carcinoma

de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). En una realización, los procedimientos de exploración de la divulgación identifican composiciones que son útiles para tratar cáncer de mama o de pulmón.

Por "receptor" se entiende un polipéptido, o parte del mismo, presente en una membrana celular que se une selectivamente a uno o más ligandos.

Por "reconocer" se entiende unirse selectivamente a una diana. Un linfocito T que reconoce un virus expresa normalmente un receptor que se une a un antígeno expresado por el virus.

Por "patógeno" se entiende un virus, bacteria, hongo, parásito o protozoo capaz de provocar enfermedad.

Los virus a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, *Retroviridae* (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HDTV-III, LAVE o HTLV-III/LAV), o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus de Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que provocan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del Ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus paragripales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bungaviridae* (por ejemplo, virus de Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus Nairo); *Arenaviridae* (virus de fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la Hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); *Poxviridae* (virus de la viruela, virus vaccinia, poxvirus); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la peste porcina Africana); y virus no clasificados (por ejemplo, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis no A, no B (clase 1 = transmitido de forma interna; clase 2 = transmitido de forma parenteral (es decir Hepatitis C); virus Norwalk y relacionados, y astrovirus).

Las bacterias a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, especies de *Pasteurella*, *Staphylococci*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen pero sin limitación, *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Estreptococo de Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo de Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.* patógena, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, y *Actinomyces israelii*.

Por "se une específicamente" se entiende un polipéptido o fragmento del mismo que reconoce y se une a un polipéptido de interés, pero que no reconoce sustancialmente ni se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye de forma natural un polipéptido de la divulgación.

La expresión "antígeno tumoral" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier polipéptido expresado por un tumor que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria.

Por "antígeno viral" se entiende un polipéptido expresado por un virus que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria.

Se pretende que las expresiones "comprende", "que comprende" tengan el significado amplio aplicado a ellas en la Ley de Patentes de Estados Unidos y puede significar "incluye", "que incluye" y similares.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" se refiere a intervención clínica en un intento de alterar el desarrollo de la enfermedad del individuo o célula que se trate, y puede realizarse para profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos terapéuticos de tratamiento incluyen, sin limitación, evitar la aparición o recurrencia de enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar metástasis, reducir la tasa de progresión de enfermedad, alivio o paliación de la

patología, y remisión o pronóstico mejorado. Evitando la progresión de una enfermedad o trastorno, un tratamiento puede evitar el deterioro debido a un trastorno en un sujeto afectado o diagnosticado o un sujeto sospechoso de tener el trastorno, pero un tratamiento también puede prevenir la aparición del trastorno o un síntoma del trastorno en un sujeto en riesgo de tener el trastorno o sospechoso de tener el trastorno.

- 5 El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano.

El término "inmunocomprometido" como se usa en el presente documento se refiere a un sujeto que tiene una inmunodeficiencia. El sujeto es muy vulnerable a infecciones oportunistas, infecciones provocadas por organismos que habitualmente no provocan enfermedad en una persona con un sistema inmunitario sano, pero puede afectar a personas con un sistema inmunitario deprimido o con mal funcionamiento.

- 10

Otros aspectos de la invención se describen en la siguiente divulgación y están dentro del ámbito de la invención.

Breve descripción de las figuras

La siguiente Descripción Detallada, proporcionada como ejemplo, pero que no se pretende que limite la invención a realizaciones específicas descritas, puede entenderse junto con los dibujos adjuntos.

- 15 Las Figuras 1a-1f muestran que la coexpresión de CD80 y 4-1BBL en linfocitos T humanos induce respuestas proliferativas robustas después de estimulaciones cíclicas a través de su receptor de linfocitos T endógeno o a través de un receptor de antígeno quimérico sin coestimulación proporcionada por células presentadoras de antígenos (APC). Se activaron $0,4 \times 10^6$ linfocitos T humanos purificados con anticuerpo para CD3 (OKT3) y se cuantificó la expansión de linfocitos T que se transdujeron por retrovirus con CD80, 4-1BBL, la combinación de los dos, o un vector de control (Figura 1a, b). Las eficacias de transducción se evaluaron por análisis de FACS 48 horas después de la transferencia génica (Figura 1a). El recuento absoluto de linfocitos T CD8⁺ transducidos con el ligando coestimulador indicado y estimulados semanalmente con $10 \mu\text{g/ml}$ de OKT3 unido a placa se representa gráficamente en la Figura 1b. La investigación se extendió a linfocitos T donadores de memoria específicos de Citomegalovirus (CMV) (Figura 1c, d) y linfocitos T autólogos redirigidos genéticamente (Figura 1e, f). Linfocitos T específicos de pp65 de CMV, brevemente expandidos en APC artificiales HLA-A*0201⁺pp65⁺ y transducidos con CD80, 4-1BBL, o una combinación de los dos (Figura 1c). Se muestran recuentos absolutos de linfocitos T CD8⁺pp65⁺ enriquecidos y transducidos como se describe en c después de reestimulación semanal con células tumorales Caco-2 que presentan pp65 HLA-A*0201⁺ en la Figura 1d. Para generar rápidamente linfocitos T humanos sensibles a cáncer de próstata (Figura 1e, f), se transdujeron por retrovirus linfocitos T de sangre periférica con el receptor de antígeno quimérico Pz1 (Gade y col., Cancer Res. 65: 9080-9088, 2005), un receptor de antígeno no restringido por HLA específico para el antígeno tumoral PSMA. El receptor Pz1 comprende un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla que se une a PSMA fusionado con el dominio de señalización ξ de CD3 humano. En la Figura 1e, los linfocitos T CD3⁺ humanos primarios se transdujeron por retrovirus con Pz1 solo o en combinación con CD80 y 4-1BBL. Las eficacias de transducción se evaluaron por análisis de FACS. La expansión de linfocitos T humanos transducidos con Pz1 cocultivados semanalmente con monocapas de tumor LNCaP se muestra en la Figura 1f. Se expresaron ligandos coestimuladores en los linfocitos T (parte superior) o las células tumorales (parte inferior). Se representan las condiciones de activación respectivas en ilustraciones mostradas en los paneles derechos de b, d y f. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Cada punto b, d y f representa la media \pm e.t.m. de tres pocillos seleccionados aleatoriamente. * indica $< 10^4$ células.

- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- Las Figuras 2a-2c muestran la erradicación de tumores de carcinoma de próstata con antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) establecidos en ratones Scid/beige por linfocitos T Pz1⁺ transducidos con CD80 y 4-1BBL. La Figura 2a muestra formación de imágenes bioluminiscentes *in vivo* y exploraciones de IRM coronales correspondientes de tumores PC3-PSMA con luciferasa de luciérnaga en ratones Scid/beige cuatro semanas después de la inoculación sistémica con 4×10^6 células tumorales (día 0 del tratamiento con linfocitos T) y dieciocho días después de la transferencia adoptiva de 4×10^6 linfocitos T CD8⁺Pz1⁺ o Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺. Se inyectó un número igual de linfocitos T que portaban el receptor de antígeno quimérico que se dirige a CD19 humano 19z en el grupo de control. Se muestran imágenes de seudocolor superpuestas sobre fotografías convencionales. Se muestran los mismos animales cuyas imágenes se tomaron antes y después del tratamiento usando captura de imágenes bioluminiscentes e IRM. Los dos ratones representan un total de n=10. La Figura 2b muestra tres gráficas. Señal tumoral bioluminiscente cuantificada por animal cada dos días durante un periodo de tiempo de 28 días. Las adquisiciones con píxeles saturados, aunque se incluyen en la Figura para permitir la comparación visual directa entre grupos, no se usaron para cuantificación de fotones sino que se repitieron a un tiempo de adquisición más corto. La gráfica muestra fotones/segundo/radio superficial (rs) frente a días después de inyección de linfocitos T. Cada línea corresponde a un animal representando cada punto el recuento de fotones medio de la adquisición ventral y dorsal por animal en cualquier punto temporal dado. La supervivencia se ilustra en la curva de Kaplan-Meier en la Figura 2c.

- 60
- Las Figuras 3a-3d muestran proliferación *in vivo* robusta, pero dependiente de antígeno tumoral, de linfocitos T CD80⁺4-1BBL⁺. La Figura 3a muestra la captura de imágenes bioluminiscentes *in vivo* comparativa de linfocitos T transferidos de forma adoptiva en ratones Scid/beige que portan tumor PC3-PSMA los días 0, 8 y 18 después de la inyección de 4×10^6 linfocitos T CD8⁺ que expresan luciferasa de elatéridos (click-luc) transducidos con

Pz1 o transducidos con Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺. Como un control de especificidad de antígenos, se infundió un número igual de linfocitos T 19z⁺CD80⁺4-1BBL⁺. El tratamiento con linfocitos T comenzó como en la Figura 2 cuatro semanas después de la inyección sistémica de 4×10^6 células tumorales PC3-PSMA. Los cinco ratones por grupo mostrados en cada panel representan un total de n=8/grupo. Las adquisiciones con pixeles saturados, aunque se muestran en la Figura para permitir la comparación visual directa, no se usaron para cuantificación de fotones sino que se repitieron a un tiempo de adquisición más corto. La Figura 3b muestra tres gráficas. Se recogieron las intensidades de señal de luciferasa de elatéridos a partir de la captura de imágenes de bioluminiscencia secuencial cada 2 días después de la transferencia de linfocitos T durante un periodo de tiempo de dieciséis días. Cada línea representa un animal mostrando cada punto el recuento de fotones medio de la adquisición ventral y dorsal por animal en cualquier punto temporal dado. La Figura 3c muestra un análisis de FACS multicolor de una suspensión de célula única de pulmón preparada a partir de un animal representativo al que se han infundido linfocitos T Pz1⁺ o Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺, 6 días después de la transferencia de linfocitos T. Las células se tiñeron con antisuero idiopático específico para el receptor de antígeno quimérico Pz1. En la Figura 3d, números de linfocitos T Pz1⁺ pulmonares absolutos (recuentos de células totales de células negativas para azul de Tripano viables x porcentajes de linfocitos T Pz1⁺). Los gráficos de barras mostrados representan la media \pm e.t.m. de tres ratones. Las Figuras 4a-4f muestran la coestimulación de linfocitos T en cis como resultado de la colocalización de CD80, 4-1BBL y sus receptores CD28 y 4-1BB en la sinapsis inmunológica después de la formación de grupos de células tumorales/linfocitos T inducida. En la Figura 4a-d, se transdujeron linfocitos T humanos de sangre periférica con Pz1 y se volvieron a estimular con células LNCaP-CD80 antes de una segunda transferencia génica con el vector bicistrónico que codifica la proteína de fusión dsRed-monómero-4-1BBL y CD80. Después del aislamiento de CD8⁺ magnético negativo, los linfocitos T se marcaron con FITC-toxina del cólera B (CTB), y se incubaron con células tumorales LNCaP no modificadas o solos. Los conjugados fijados se permeabilizaron, se tiñeron con los antisueros indicados y se visualizaron con microscopía confocal. Se seleccionaron aleatoriamente grupos de linfocitos T-células LNCaP de tres experimentos independientes. Barras de escala, 10 μ m. Los números de grupos con concentraciones claras del ligando coestimulador indicado o receptor en el punto de contacto de linfocitos T-APC frente al número total de grupos analizados se muestra en los paneles inferiores derechos de la Figura 4a y b.

La Figura 4a es un conjunto de diez micrografías confocales que ejemplifican la polarización de 4-1BBL, expresado como una proteína de fusión de ds-Red en combinación con CD80 en linfocitos T transducidos con Pz1 CD8⁺, en la sinapsis inmunológica. Los grupos de tumor LnCaP/linfocitos T se incubaron durante 50 minutos antes de su fijación, permeabilización e incubación con antisuero anti 4-1BB. En la Figura 4b, los grupos de células tumorales-linfocitos T fijados se incubaron con antisueros anti-CD80 y anti-CD28. De nuevo, se visualiza la colocalización de CD80 con su receptor CD28 en la sinapsis inmunológica después del encuentro con antígeno tumoral. La Figura 4c ilustra la acumulación aumentada de granzima B en la sinapsis inmunológica. Esta acumulación depende de un acoplamiento funcional de 4-BB por su ligando 4-BBL, que se expresa en la misma superficie de linfocitos T. Los linfocitos T humanos primarios se modificaron genéticamente como en la Figura 4a, b. Como se indica, los vectores retrovirales que codifican Pz1 también expresan ARNph de control o ARNph que se dirige a 4-1BB bajo el control del promotor U6 en su LTR3' como se describe posteriormente en el presente documento. Los conjugados celulares en la fila superior (ARNph de control Pz1⁺) y media (y ARNph de control Pz1⁺CD80⁺dsred 4-1BBL⁺) representan linfocitos T no transducidos y transducidos con dsred 4-1BBL CD80⁺, respectivamente, cultivados en el mismo pocillo y conjugados con LnCaP en el mismo portaobjetos de vidrio. La Figura 4d muestra el índice de reclutamiento relativo (IRR) y la intensidad relativa, calculada como se describe posteriormente en el presente documento, de Granzima-B-Alexa 647 en la interfase de células presentadoras de antígenos – linfocitos T. Los puntos de datos en cada grupo muestran el valor calculado de 35 conjugados analizados (símbolos) y sus medias (-) de tres experimentos independientes. *P = 0,0001; **P < 0,0001. En la Figura 4e, f se muestran ensayos de luciferasa NF- κ B en clones de linfocitos T únicos aislados. Estos resultados corroboran la autoestimulación como un mecanismo que actúa en el suministro de señales coestimuladoras. Se transdujo con retrovirus un clon de linfocitos T CD3⁺CD28⁺4-1BB-Jurkat transfectado de forma estable con un indicador de luciferasa NF- κ B con un vector tricistrónico que coexpresaba 4-1BB, 4-1BBL y CD80 o un vector de control. Para impedir la coestimulación de testigo, se subclonaron linfocitos T transducidos en placas de 96 pocillos revestidas con OKT-3 antes de la primera expresión en superficie detectable de proteínas codificadas. Doce horas después de la activación, se confirmó la presencia de linfocitos T únicos en los pocillos por microscopía y se midió la señal bioluminiscente en un nivel de célula única. La Figura 4e muestra 36 adquisiciones de bioluminiscencia de linfocitos T únicos transducidos ensambladas con software Adobe Illustrator. Se cuantificaron señales de célula única bioluminiscentes respectivas, se normalizaron a bioluminiscencia de fondo, y se representaron en la Figura 4f. Las Figuras 5a-5e muestran que los linfocitos T que presentan CD80 y 4-1BBL coestimulan in trans linfocitos T testigos específicos de antígeno no modificados a través de contacto físico. La Figura 5a muestra un conjunto de 4 microfotografías confocales de un linfocito T Pz1⁺ que interacciona con una célula tumoral LNCaP mientras está en contacto físico entre linfocitos T con un linfocito T Pz1⁺ testigo transducido con CD80 y dsRed-4-1BBL. Los grupos celulares se indujeron y se analizaron como se describe en la Figura 4a, b. Barras de escala 10 μ m. En la Figura 5b-d, se transdujeron linfocitos T periféricos de un donador HLA A2.1⁺ seropositivo para citomegalovirus (CMV) con Pz1 o se cotransdujeron con Pz1, CD80 y 4-1BBL. En paralelo, se enriquecieron linfocitos T citotóxicos no modificados genéticamente específicos de CMV (CTL) del mismo donador por

cocultivo con células presentadoras de antígenos artificiales (AAPC) como se describe posteriormente en el presente documento. Estas células se marcaron con carboxifluoresceín succinimidil éster (CFSE). Se mezclaron linfocitos T Pz1⁺ (Figura 5b) o Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺ (Figura 5c) distribuidos en perlas con CTL pp65⁺ sensibles a CMV expandidos a una relación 1:1 y se expusieron a células tumorales Caco-2 irradiadas transducidas por retrovirus para presentar pp65 en superficie de una manera dependiente de HLA A2.1, así como PSMA de una manera independiente de HLA. Como alternativa, una membrana de transwell separó los linfocitos T Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺ de linfocitos T pp65⁺, que interactúan ambos con el tumor Caco-2 (Figura 5d). Las condiciones de cocultivo respectivas se representan en ilustraciones mostradas en la izquierda. Dos días después del contacto con antígeno tumoral los niveles de Granzima B intracelular seleccionados en linfocitos T CD8⁺ se cuantificaron por análisis de FACS (columna media). Se resumen en la parte superior de cada perfil las intensidades de fluorescencia medias (IFM) de células presentadoras de antígenos (APC)-Granzima B de las subpoblaciones de linfocitos T CFSE⁻ (Pz1⁺) y CFSE⁺ (pp65⁺). El día 7 se analizaron las diluciones de CFSE y linfocitos T Pz1⁺ en comparación con pp65⁺ por citometría de flujo después de tinción con tetramero de pp65 y CD8 (columna derecha). Las IFM-CFSE indicadas en la parte superior de cada perfil se basan en poblaciones pp65⁺ después de selección de CD8⁺. Los recuentos celulares totales de linfocitos T CD8⁺ pp65⁺ después de los cultivos de 7 días se representan gráficamente en la (Figura 5e). Cada gráfico de barras representa la media ± e.t.m. de tres pocillos seleccionados de forma aleatoria. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. No se añadieron citocinas exógenas en ningún punto del cocultivo.

Las Figuras 6a y 6b muestran que la acumulación de linfocitos T redirigidos a PSMA transferido de forma adoptiva en sitios tumorales aumenta por linfocitos T Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺, pero no 19z⁺CD80⁺4-1BBL⁺ en ratones Scid/beige. La Figura 6a muestra captura de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* dual de luciferasa de *Gaussia* externa (x-gaus-luc) en tumores Raji y RM1.PGLS además de luciferasa de elatéricos (Click-luc) en linfocitos T que se dirigen a tumor. Dos semanas después de la inyección sistémica de 1 x 10⁶ tumores Raji CD19⁺x-gaus-luc⁺ y dos días después de la infusión posterior de 5 x 10⁵ células tumorales RM1.PGLS PS-MA⁺x-gaus-luc⁺ en los mismos animales, los tumores establecidos en la médula ósea (Raji) y pulmón (RM1) se trataron con una combinación de tres poblaciones celulares de linfocitos T transducidos como se ha indicado. Cada animal recibió un total de 12 x 10⁶ linfocitos T CD8⁺ receptor de antígeno quimérico⁺ (4 x 10⁶ linfocitos T/condición de transducción). Notablemente, la población de linfocitos T enumerada en tercer lugar (Pz1⁺, Pz1⁺CD80⁺4-1BBL⁺, 19z⁺CD80⁺4-1BBL⁺, fila izquierda, media, derecha, respectivamente) se inyectó doce horas después de la inyección combinada de linfocitos T enumerados en primer y segundo lugar para evitar la interacción entre linfocitos T en el pulmón debido a la acumulación y no como resultado de unión al antígeno tumoral selectivo. En los puntos temporales indicados las células tumorales x-gaus-luc⁺ o linfocitos T click-luc⁺ se supervisaron por captura de imágenes bioluminiscentes. El día 0 y el día 4 un periodo de tiempo de al menos 4 horas entre la captura de imágenes de tumor y de linfocitos T aseguró que la señal bioluminiscente volviera a niveles de fondo. Se capturaron imágenes de un número total de n=5 ratones Scid/beige por grupo de tratamiento. La Figura 5b muestra una serie de 6 gráficas que cuantifican las intensidades de señal de luciferasa de elatérico a partir de la captura de imágenes de bioluminiscencia secuencial cada día después de la transferencia de linfocitos T durante un periodo de tiempo de cuatro días. Cada línea representa un animal mostrando cada punto el recuento de fotones medio medido sobre el área pulmonar (parte superior) o ambos fémures (parte inferior), respectivamente en cualquier punto temporal dado.

La Figura 7 muestra que CD80 y 4-1BBL expresados en linfocitos T duales inducen expansión de linfocitos T superior en comparación con elementos de señalización de CD28 y/o 4-1BB fusionados en serie con el dominio de señalización ξ del receptor de antígeno quimérico Pz1. Los linfocitos T primarios se transdujeron con Pz1, P28z (Maher y col. Nature Biotechnology, Vol 20, Ene 2002, 70-75), que contiene el dominio de señalización de CD28 en serie con la cadena ξ , o P284-1BBz que incluye regiones de señalización tanto de CD28 como de 4-1BB. Como alternativa, los linfocitos T se cotransdujeron con P28z y 4-1BBL (indicado como P28z + 4-1BBL). Pz1 + CD80 + 4-1BBL se refiere a linfocitos T Pz1+ que coexpresan ambos ligandos, CD80 y 4-1BBL. Los linfocitos T transducidos se estimularon semanalmente (indicado por flechas) en monocapas tumorales de LNCaP en condiciones representadas en detalle en la Figura 1. La expansión en veces de la población de linfocitos T humanos transducidos con Pz1 CD8⁺ se representa gráficamente.

La Figura 8 proporciona secuencias de aminoácidos para CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona en general células, incluyendo células inmunosensibles modificadas genéticamente (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos Citolíticos Naturales (NK), linfocitos T citotóxicos (CTL)) que expresan al menos uno de un receptor de reconocimiento de antígenos y un ligando coestimulador y procedimientos de uso de los mismos para el tratamiento de neoplasia y otras patologías en las que se desea un aumento de la respuesta inmunitaria específica de antígeno. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la expresión retroviral constitutiva de CD80 y 4-1BBL en linfocitos T humanos cotransducidos que se dirigen a antígeno de membrana específico de próstata indujo una proliferación de linfocitos T dependiente de antígeno tumoral robusta acompañada de un rechazo *in vivo* profundo de tumores de carcinoma de próstata bien establecidos diseminados. Además, los linfocitos T que expresan CD80 y 4-1BBL proporcionaron coestimulación de linfocitos T testigos en trans de manera dependiente de contacto y específica de antígeno en el sitio tumoral. Tomados juntos, el concepto de linfocitos T modificados genéticamente como un grupo constitutivo de ligandos coestimuladores para coestimularse de forma óptima a sí mismos además de potenciar la inmunogenicidad dentro del microambiente

tumoral representan un avance significativo frente a la terapia con linfocitos T adoptiva convencional. Además, como se demuestra *ex vivo* usando linfocitos T específicos de CMV enriquecidos, este enfoque no se limita al tratamiento de neoplasias, sino que es susceptible de una amplia serie de aplicaciones en las que se desea un aumento de la respuesta inmunitaria específica de antígeno, incluyendo tales aplicaciones no solamente el tratamiento de neoplasias, sino también la potenciación de una respuesta inmunitaria frente a una infección por patógenos, una enfermedad infecciosa y reforzar la tolerancia inmune en linfocitos T reguladores en el contexto de autoinmunidad o trasplante alogénico.

Linajes celulares hematopoyéticos

Las células hematopoyéticas de mamífero (sangre) proporcionan una serie de actividades fisiológicas diversas. Las células hematopoyéticas se dividen en linajes linfoide, mieloide y eritroide. El linaje linfoide, que comprende linfocitos B, T y citolíticos naturales (NK) posibilita la producción de anticuerpos, regulación del sistema inmunitario celular, detección de agentes extraños en la sangre, detección de células ajenas al huésped y similares. La expresión "linfocitos T" como se usa en el presente documento se refiere a linfocitos que maduran en el timo y son principalmente responsables de la inmunidad mediada por células. Los linfocitos T están implicados en el sistema inmunitario adaptativo. La expresión "linfocitos citolíticos naturales (NK)" como se usa en el presente documento se refiere a linfocitos que son parte de la inmunidad mediada por células y actúan durante la respuesta inmunitaria innata. No requieren activación previa para realizar su efecto citotóxico en células diana. Los linfocitos T citotóxicos (CTL o linfocitos T citolíticos) son un subconjunto de linfocitos T capaces de inducir la muerte de células tumorales o somáticas infectadas.

Células para su uso en los procedimientos

La presente divulgación proporciona células que expresan al menos uno de un receptor que reconoce antígenos y un ligando coestimulador y procedimientos para usar tales células para tratamiento de una enfermedad que requiere una respuesta inmunitaria potenciada. En un enfoque, los linfocitos T específicos de antígeno tumoral, linfocitos NK, linfocitos CTL y otras células inmunosensibles se usan como lanzaderas para el enriquecimiento selectivo de uno o más ligandos coestimuladores para el tratamiento o prevención de neoplasia. Por ejemplo, los ligandos coestimuladores 4-1BBL y CD80 expresados en un linfocito T se coexpresan constitutivamente en un linfocito T que expresa un receptor de antígeno quimérico PZ1 que reconoce y se une a Antígeno de Membrana Específico de Próstata (PSMA). Tales células se administran a un sujeto humano que lo necesite para el tratamiento o prevención de cáncer de próstata. En otro enfoque, pueden usarse linfocitos T específicos de antígeno viral, linfocitos NK, linfocitos CTL para el tratamiento de enfermedades virales. Por ejemplo, CD80 y 4-1BBL se expresan en linfocitos T citotóxicos específicos de citomegalovirus (CMV) para el tratamiento de CMV.

Linfocitos T específicos de antígeno tumoral (y linfocitos NK)

Los tipos de linfocitos humanos específicos de antígeno tumoral que pueden usarse en los procedimientos incluyen, sin limitación, linfocitos donadores periféricos modificados genéticamente para expresar receptores de antígenos quiméricos (CAR) (Sadelain, M., y col. 2003 Nat Rev Cancer 3: 35-45), linfocitos donadores periféricos modificados genéticamente para expresar un complejo receptor de linfocitos T que reconoce antígeno tumoral de longitud completa que comprende el heterodímero α y β (Morgan, R. A., y col. 2006 Science 314: 126-129), cultivos de linfocitos derivados de linfocitos que se infiltran en tumores (TIL) en biopsias tumorales (Panelli, M. C., y col. 2000 J Immunol 164: 495-504; Panelli, M. C., y col. 2000 J Immunol 164: 4382-4392) y leucocitos de sangre periférica específicos de antígeno expandidos *in vitro* de forma selectiva que emplean células presentadoras de antígenos artificiales (AAPC) o células dendríticas pulsadas (Dupont, J., y col. 2005 Cancer Res 65: 5417-5427; Papanicolaou, G. A., y col. 2003 Blood 102: 2498-2505). Los linfocitos T pueden ser autólogos, alogénicos o derivados *in vitro* de células madre o progenitoras obtenidas por ingeniería genética.

Cualquier antígeno tumoral adecuado (péptido antigénico) es adecuado para su uso en las realizaciones relacionadas con tumor descritas en el presente documento. Las fuentes de antígeno incluyen, pero sin limitación, proteínas de cáncer. El antígeno puede expresarse como un péptido o como una proteína intacta o parte de la misma. La proteína intacta o una parte de la misma puede ser nativa o estar mutada. Un antígeno adecuado es antígeno de membrana específico de próstata (PSMA).

Linfocitos T específicos de antígeno viral (y linfocitos NK)

Antígenos adecuados para su uso en el tratamiento de infección por patógenos u otra enfermedad infecciosa, por ejemplo, en un sujeto inmunocomprometido, incluyen, sin limitación, antígenos virales presentes en Citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (VEB), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y virus de la gripe.

La fuente no purificada de CTL puede ser cualquiera conocida en la técnica, tal como la médula ósea, fetal, neonato o adulto u otra fuente de células hematopoyéticas, por ejemplo, hígado fetal, sangre periférica o sangre del cordón umbilical. Pueden emplearse diversas técnicas para separar las células. Por ejemplo, los procedimientos de selección negativos pueden retirar inicialmente células no CTL. Los mAb son particularmente útiles para identificar marcadores asociados con linajes celulares particulares y/o etapas de diferenciación para selecciones tanto positivas como negativas.

Una gran proporción de células diferenciadas terminalmente puede retirarse inicialmente por una separación relativamente rudimentaria. Por ejemplo, pueden usarse inicialmente separaciones por perlas magnéticas para retirar grandes números de células irrelevantes. Preferentemente, se retirará al menos aproximadamente el 80 %, habitualmente al menos el 70 % de las células hematopoyéticas totales antes del aislamiento celular.

- 5 Los procedimientos para separación incluyen, pero sin limitación, centrifugación en gradiente de densidad; resedimentación; acoplamiento con partículas que modifican la densidad celular; separación magnética con perlas magnéticas revestidas con anticuerpos; cromatografía de afinidad; agentes citotóxicos unidos a o usados junto con un mAb, incluyendo, pero sin limitación, complemento y citotoxinas; y selección con anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo placa, microplaca, decantación o cualquier otra técnica conveniente.
- 10 Las técnicas para separación y análisis incluyen, pero sin limitación, citometría de flujo, que puede tener diversos grados de sofisticación, por ejemplo, una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de la luz obtusos y de ángulo bajo, canales de impedancia.

Las células pueden seleccionarse frente a células muertas, empleando colorantes asociados con células muertas tales como yoduro de propidio (PI). Preferentemente, las células se recogen en un medio que comprende suero de ternero fetal 2 % (FCS) o albúmina de suero bovino 0,2 % (BSA) o cualquier otro medio adecuado, preferentemente estéril, isotónico.

- 15 En consecuencia, la divulgación proporciona en general una célula inmunosensible, tal como un linfocito T específico de tumor o virus que comprende un receptor que se une a un antígeno y un ligando coestimulador exógeno (por ejemplo, CD80, 4-1BBL, OX40L, CD70 y CD30L).

20 **Vectores**

Puede conseguirse modificación genética de células inmunosensibles (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos CTL, linfocitos NK) transduciendo una composición de células sustancialmente homogénea con una construcción de ADN recombinante. Preferentemente, se emplea un vector retroviral (gamma-retroviral o lentiviral) para la introducción de la construcción de ADN en la célula. Por ejemplo, un polinucleótido que codifique una proteína de ligando coestimulador (por ejemplo, ligando de factor de necrosis tumoral (TNF), tal como 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT, y CD30L, o un ligando de la superfamilia de Ig, tal como CD80 y CD86), o un receptor que se une a un antígeno, o una variante, o un fragmento del mismo, puede clonarse en un vector retroviral y puede dirigirse expresión a partir de su promotor endógeno, desde la repetición terminal larga retroviral o desde un promotor específico para un tipo celular diana de interés. También pueden usarse vectores no virales.

30 *Ligandos coestimuladores*

La interacciones con al menos un ligando coestimulador proporciona una señal no específica de antígeno requerida para activación completa de un linfocito T. Los ligandos coestimuladores incluyen, sin limitación, ligandos de factor de necrosis tumoral (TNF), citocinas (tales como IL-2, IL-12, IL-15 o IL21), y ligandos de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig).

35 *Ligandos de TNF*

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citocina implicada en la inflamación sistémica y estimula la reacción de fase aguda. Su papel principal está en la regulación de células inmunitarias. Los ligandos de factor de necrosis tumoral (TNF) comparten varias características comunes. La mayoría de los ligandos se sintetizan como proteínas de transmembrana de tipo II (extremo C terminal extracelular) que contienen un segmento citoplasmático corto y una región extracelular relativamente larga. Los ligandos de TNF incluyen, sin limitación, factor de crecimiento nervioso (NGF), CD40L (CD40L)/CD154, CD137L/4-1BBL, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), CD134L/OX40L/CD252, CD27L/CD70, ligando Fas (FasL), CD30L/CD153, factor de necrosis tumoral beta (TNF β)/linfotóxina alfa (LT α), linfotóxina beta (LT β), CD257/factor activador de linfocitos B (BAFF)/Blys/THANK/Tall-1, ligando de Receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITRL) y ligando que induce apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), LIGHT (TNFSF 14).

45 *Ligandos de la superfamilia de Ig*

La superfamilia de inmunoglobulina (Ig) es un grupo grande de proteínas de superficie celular y solubles que están implicadas en los procesos de reconocimiento, unión o adhesión de células. Estas proteínas comparten elementos estructurales con inmunoglobulinas, poseen un dominio de inmunoglobulina (plegamiento). Los ligandos de la superfamilia de inmunoglobulina incluyen, sin limitación, CD80 y CD86, ambos ligandos para CD28.

50 Para modificación genética inicial de las células para proporcionar células específicas de antígeno viral o de tumor, se emplea generalmente un vector retroviral para transducción, sin embargo puede usarse cualquier otro sistema de suministro o vector viral adecuado. Para modificación genética posterior de las células para proporcionar células que comprendan un complejo presentador de antígenos que comprenda al menos dos ligandos coestimuladores, la transferencia génica retroviral (transducción) demuestra ser eficaz de forma similar. También son adecuadas

- 55

combinaciones de retrovirus y una línea de empaquetamiento apropiada, en las que las proteínas de la cápsida serán funcionales para infectar células humanas. Se conocen diversas líneas celulares productoras de virus anfotrópicos, incluyendo, pero sin limitación, PA12 (Miller, y col. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 431-437); PA317 (Miller, y col. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 2895-2902); y CRIP (Danos, y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6460-6464).
 5 También son adecuadas partículas no anfotrópicas, por ejemplo, partículas pseudotipadas con envoltura de VSVG, RD114 o GALV y cualquier otra conocida en la técnica.

Los posibles procedimientos de transducción también incluyen cocultivo directo de las células con células productoras, por ejemplo, por el procedimiento de Bregni, y col. (1992) Blood 80: 1418-1422, o cultivando con sobrenadante viral solamente o reservas de vector concentradas con o sin factores de crecimiento apropiados y policones, por ejemplo, por el procedimiento de Xu, y col. (1994) Exp. Hemat. 22: 223-230; y Hughes, y col. (1992) J. Clin. Invest. 89: 1817.

Pueden usarse otros vectores virales de transducción para expresar un ligando coestimulador de la divulgación en una célula inmunosensible. Preferentemente, el vector seleccionado muestra alta eficacia de infección e integración y expresión estables (véase, por ejemplo, Cayouette y col., Human Gene Therapy 8: 423-430, 1997; Kido y col., Current Eye Research 15: 833-844, 1996; Bloomer y col., Journal of Virology 71: 6641-6649, 1997; Naldini y col., Science 272: 263-267, 1996; y Miyoshi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 10319,1997). Otros vectores virales que pueden usarse incluyen, por ejemplo, vectores adenovirales, lentivirales y de virus adenoasociados, virus vaccinia, un virus del papiloma bovino, o un virus del herpes, tal como Virus de Epstein-Barr Virus (véase también, por ejemplo, los vectores de Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244: 1275-1281, 1989; Eglitis y col., BioTechniques 6: 608-614, 1988; Tolstoshev y col., Current Opinion in Biotechnology 1: 55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337: 1277-1278, 1991; Cornetta y col., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36: 311-322, 1987; Anderson, Science 226: 401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17: 407-416, 1991; Miller y col., Biotechnology 7: 980-990, 1989; Le Gal La Salle y col., Science 259: 988-990, 1993; y Johnson, Chest 107: 77S-83S, 1995). Los vectores retrovirales están particularmente bien desarrollados y se han usado en situaciones clínicas (Rosenberg y col., N. Engl. J. Med 323: 370, 1990; Anderson y col., Patente de Estados Unidos N° 5.399.346).

También pueden emplearse enfoques no virales para la expresión de una proteína en una célula. Por ejemplo, puede introducirse una molécula de ácido nucleico en una célula administrando el ácido nucleico en presencia de lipofección (Feigner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 7413, 1987; Ono y col., Neuroscience Letters 17: 259, 1990; Brigham y col., Am. J. Med. Sci. 298: 278, 1989; Staubinger y col., Methods in Enzymology 101: 512,1983), conjugación de polilisina asialoorosomucoide (Wu y col., Journal of Biological Chemistry 263: 14621, 1988; Wu y col., Journal of Biological Chemistry 264: 16985, 1989) o por microinyección en condiciones quirúrgicas (Wolff y col., Science 247: 1465, 1990). Otros medios no virales para transferencia génica incluyen transfección *in vitro* usando fosfato cálcico, DEAE dextrano, electroporación y fusión de protoplastos. Los liposomas también pueden ser potencialmente beneficiosos para suministro del ADN a una célula. También puede conseguirse trasplante de genes normales en los tejidos afectados de un sujeto transfiriendo un ácido nucleico normal en un tipo celular cultivable *ex vivo* (por ejemplo, una célula primaria autóloga o heteróloga o descendencia de la misma). Después de lo cual la célula (o sus descendientes) se inyectan en un tejido diana o se inyectan de forma sistémica.

La expresión de ADNc para su uso en procedimientos de terapia de polinucleótidos puede dirigirse desde cualquier promotor adecuado (por ejemplo, los promotores de citomegalovirus humano (CMV), virus de simio 40 (SV40) o metalotioneína) y regularse por cualquier elemento regulador de mamífero apropiado. Por ejemplo, si se desea, pueden usarse potenciadores que se sabe que dirigen preferentemente la expresión génica en tipos celulares específicos para dirigir la expresión de un ácido nucleico. Los potenciadores usados pueden incluir, sin limitación, los que se caracterizan como potenciadores específicos de tejido o célula. Como alternativa, si se usa un clon genómico como una construcción terapéutica, la regulación puede estar mediada por las secuencias reguladoras afines o, si se desea, por secuencias reguladoras derivadas de una fuente heteróloga, incluyendo cualquiera de los promotores o elementos reguladores descritos anteriormente.

Las células resultantes pueden después cultivarse en condiciones similares a las de células no modificadas, por lo que las células modificadas pueden expandirse y usarse para una diversidad de fines.

Polipéptidos y análogos

También se incluyen polipéptidos PZ1, P28z, 4-1BBL, OX40L, CD70, LIGHT y CD30L o fragmentos de los mismos que se modifican de maneras que potencian su actividad antineoplásica cuando se expresan en una célula inmunosensible. La divulgación proporciona procedimientos para optimizar una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico produciendo una alteración en la secuencia. Tales alteraciones pueden incluir ciertas mutaciones, deleciones, inserciones o modificaciones postraduccionales. La divulgación incluye además análogos de cualquier polipéptido de origen natural de la divulgación. Los análogos pueden diferir de un polipéptido de origen natural en diferencias de secuencia de aminoácidos, en modificaciones postraduccionales, o en ambas. Los análogos generalmente mostrarán al menos el 85 %, más preferentemente el 90 % y más preferentemente el 95 % o incluso el 99 % de identidad con toda o parte de una secuencia de aminoácidos de origen natural. La longitud de la comparación de secuencia es de al menos 5, 10, 15 o 20 restos de aminoácidos, preferentemente al menos 25, 50, o 75 restos de aminoácidos y más preferentemente más de 100 restos de aminoácidos. De nuevo, en un enfoque a

modo de ejemplo para determinar el grado de identidad, puede usarse un programa BLAST, indicando una puntuación de probabilidad entre e-3 y e-100 una secuencia cercanamente relacionada. Las modificaciones incluyen derivación química *in vivo* e *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación o glicosilación; tales modificaciones pueden producirse durante la síntesis o procesamiento de polipéptidos o después del tratamiento con enzimas modificadoras aisladas. Los análogos también pueden diferir de los polipéptidos de origen natural por atracciones en secuencia primaria. Estos incluyen variantes genéticas, tanto naturales como inducidas (por ejemplo, resultantes de mutagénesis aleatoria por irradiación o exposición a etanometilsulfato o por mutagénesis específica como se describe en Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed.), CSH Press, 1989, o Ausubel y col., mencionado anteriormente). También se incluyen péptidos ciclados, moléculas y análogos que contienen restos distintos de aminoácidos L, por ejemplo, aminoácidos D o aminoácidos de origen no natural o sintético, por ejemplo, aminoácidos beta o gamma.

Además de polipéptidos de longitud completa, la divulgación también proporciona fragmentos de uno cualquiera de los polipéptidos o dominios peptídicos. Como se usa en el presente documento, la expresión "un fragmento" significa al menos 5, 10, 13 o 15 aminoácidos. En otras realizaciones, un fragmento es de al menos 20 aminoácidos contiguos, al menos 30 aminoácidos contiguos, o al menos 50 aminoácidos contiguos, y en otras realizaciones al menos 60 a 80, 100, 200, 300 o más aminoácidos contiguos. Pueden generarse fragmentos por procedimientos conocidos por los expertos en la materia o pueden resultar de procesamiento normal de proteínas (por ejemplo, retirada de aminoácidos del polipéptido naciente que no se requieren para la actividad biológica o retirada de aminoácidos por acontecimientos de corte y empalme alternativo de ARNm o procesamiento alternativo de proteínas).

Los análogos no proteicos tienen una estructura química diseñada para imitar la actividad funcional de una proteína. Tales análogos se administran de acuerdo con procedimientos de la divulgación. Tales análogos pueden exceder la actividad fisiológica del polipéptido original. Se conocen bien en la técnica procedimientos de diseño de análogos, y puede llevarse a cabo síntesis de análogos de acuerdo con tales procedimientos modificando las estructuras químicas de modo que los análogos resultantes aumenten la actividad antineoplásica del polipéptido original cuando se expresa en una célula inmunosensible. Estas modificaciones químicas incluyen, pero sin limitación, sustituir grupos R alternativos y variar el grado de saturación en átomos de carbono específicos de un polipéptido de referencia. Preferentemente, los análogos proteicos son relativamente resistentes a degradación *in vivo*, dando como resultado un efecto terapéutico más prolongado tras su administración. Los ensayos para medir la actividad funcional incluyen, pero sin limitación, los descritos en los ejemplos posteriores.

Administración

Pueden proporcionarse composiciones que comprenden células inmunosensibles modificadas genéticamente (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos NK, linfocitos CTL o sus progenitores) de forma sistémica o directamente a un sujeto para el tratamiento de una neoplasia, infección por patógenos o enfermedad infecciosa. En una realización, las células se inyectan directamente a un órgano de interés (por ejemplo, un órgano afectado por una neoplasia). Como alternativa, se proporcionan composiciones que comprenden células inmunosensibles modificadas genéticamente indirectamente al órgano de interés, por ejemplo, mediante administración al sistema circulatorio (por ejemplo, la vasculatura tumoral). Pueden proporcionarse agentes de expansión y diferenciación antes de, durante o después de la administración de las células para aumentar la producción de linfocitos T, linfocitos NK o linfocitos CTL *in vitro* o *in vivo*.

Las células modificadas pueden administrarse en cualquier vehículo fisiológicamente aceptable, normalmente por vía intravascular, aunque también pueden introducirse en huesos u otro lugar conveniente en el que las células puedan encontrar un espacio apropiado para regeneración y diferenciación (por ejemplo, timo). Habitualmente, se administrarán al menos 1×10^5 células, alcanzando con el tiempo 1×10^{10} o más. Las células inmunosensibles modificadas genéticamente pueden comprender una población purificada de células. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente el porcentaje de células inmunosensibles modificadas genéticamente en una población usando diversos procedimientos bien conocidos, tales como separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los intervalos preferibles de pureza en las poblaciones que comprenden células inmunosensibles modificadas genéticamente son de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 55 %, de aproximadamente el 55 a aproximadamente el 60 %, y de aproximadamente el 65 a aproximadamente el 70 %. Más preferentemente la pureza es de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 75 %, de aproximadamente el 75 a aproximadamente el 80 %, de aproximadamente el 80 a aproximadamente el 85 %; y aún más preferentemente la pureza es de aproximadamente el 85 a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 90 a aproximadamente el 95 %, y de aproximadamente el 95 a aproximadamente el 100 %. Las dosificaciones pueden ajustarse fácilmente por los expertos en la materia (por ejemplo, una reducción de la pureza puede requerir un aumento de la dosificación). Las células pueden introducirse por inyección, catéter o similares. Si se desea, también pueden incluirse factores, incluyendo, pero sin limitación, interleucinas, por ejemplo IL-2, IL-3, IL-6 e IL-11, así como las otras interleucinas, los factores estimulantes de colonias, tales como G-, M- y GM-CSF, interferones, por ejemplo interferón gamma y eritropoyetina.

Las composiciones incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden células inmunosensibles modificadas genéticamente o sus progenitores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La administración puede ser autóloga

o heteróloga. Por ejemplo, pueden obtenerse células inmunosensibles o progenitoras de un sujeto, y administrarse al mismo sujeto o un sujeto compatible diferente.

5 Las células inmunosensibles derivadas de sangre periférica o su descendencia (por ejemplo, derivadas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) pueden administrarse mediante inyección localizada, incluyendo administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que contenga una célula inmunosensible modificada genéticamente), esta generalmente se formulará en una forma inyectable farmacéutica unitaria (solución, suspensión, emulsión).

Formulaciones

10 Las composiciones de la divulgación que comprenden células inmunosensibles modificadas genéticamente pueden proporcionarse convenientemente como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones, o composiciones viscosas, que pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas son normalmente más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y composiciones sólidas. Adicionalmente, las composiciones líquidas son algo más
15 convenientes para administrar, especialmente por inyección. Las composiciones viscosas, por otro lado, pueden formularse dentro del intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar periodos de contacto más largos con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender vehículos, que pueden ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los
20 mismos.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando las células inmunosensibles modificadas genéticamente en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversas cantidades de los otros ingredientes, según se desee. Tales composiciones pueden estar en mezcla con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones también pueden
25 liofilizarse. Las composiciones pueden contener sustancias adyuvantes tales como agentes humectantes, de dispersión o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes tamponantes de pH, aditivos potenciadores de viscosidad o gelificantes, conservantes, agentes saporíferos, colorantes y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Pueden consultarse textos convencionales tales como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17ª edición, 1985, para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación
30 indebida.

Pueden añadirse diversos aditivos que potencien la estabilidad y esterilidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos puede asegurarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Puede proporcionarse absorción prolongada de la forma farmacéutica
35 inyectable mediante el uso de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Sin embargo, cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado tendría que ser compatible con las células inmunosensibles modificadas genéticamente o sus progenitores.

Las composiciones pueden ser isotónicas, es decir, pueden tener la misma presión osmótica que la sangre y el líquido lacrimal. La isotonicidad deseada de las composiciones puede conseguirse usando cloruro sódico, u otros
40 agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. Se prefiere particularmente cloruro sódico para tampones que contengan iones sódicos.

La viscosidad de las composiciones, si se desea, puede mantenerse al nivel seleccionado usando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Se prefiere metilcelulosa debido a que está disponible fácil y
45 económicamente y es fácil trabajar con ella. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma de xantano, carboximetil celulosa, hidroxipropil celulosa, carbómero y similares. La concentración preferida del espesante dependerá del agente seleccionado. Lo importante es usar una cantidad que consiga la viscosidad seleccionada. Obviamente, la elección de vehículos adecuados y otros aditivos dependerá de la vía exacta de administración y la naturaleza de la forma farmacéutica particular, por ejemplo, forma farmacéutica líquida (por
50 ejemplo, si la composición va a formularse en una solución, una suspensión, gel u otra forma líquida, tal como una forma de liberación temporalizada o forma cargada de líquido).

Los expertos en la materia se darán cuenta que los componentes de las composiciones deberían seleccionarse para ser químicamente inertes y que no afectarán a la viabilidad o la eficacia de las células inmunosensibles modificadas genéticamente como se describen en el presente documento. Esto no presentará problemas para los expertos en los
55 principios químicos y farmacéuticos, o presentará problemas que puedan evitarse fácilmente por referencia a textos convencionales o por experimentos sencillos (sin implicar experimentación indebida), a partir de la presente divulgación y los documentos citados en el presente documento.

Una consideración con respecto al uso terapéutico de células inmunosensibles modificadas genéticamente es la

cantidad de células necesaria para conseguir un efecto óptimo. La cantidad de células para administrar variará para el sujeto que se trate. En una realización, se administran entre 10^4 y 10^{10} , entre 10^5 y 10^9 , o entre 10^6 y 10^8 células inmunosensibles modificadas genéticamente a un sujeto humano. En realizaciones preferidas, se administran al menos aproximadamente 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 y 5×10^8 células inmunosensibles modificadas genéticamente a un sujeto humano. La determinación precisa de lo que se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada sujeto, incluyendo su talla, edad, sexo, peso y afección del sujeto en particular. Las dosificaciones pueden establecerse fácilmente por los expertos en la materia a partir de la presente divulgación y el conocimiento de la técnica.

El experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de células y aditivos, vehículos y/o excipientes opcionales en composiciones y para administrar en los procedimientos. Normalmente cualquier aditivo (además de la célula o las células madre activas y/o agente o agentes) está presente en una cantidad de solución de 0,001 a 50 % (en peso) en solución salina tamponada con fosfato y el principio activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 5 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 1 % en peso, aún más preferentemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 0,05 % en peso o de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 20 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 10 % en peso y aún más de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 5 % en peso. Por supuesto, para administrar cualquier composición a un animal o ser humano, y para cualquier procedimiento particular de administración, se prefiere determinar por lo tanto: toxicidad, tal como determinar la dosis letal (DL) y DL50 en un modelo animal adecuado por ejemplo, roedor tal como ratón; y la dosificación de la composición o las composiciones, concentración de componentes en las mismas y momento de administración de la composición o las composiciones, que inducen una respuesta adecuada. Tales determinaciones no requieren experimentación indebida a partir del conocimiento del experto en la materia, la presente divulgación y los documentos citados en el presente documento. Y el tiempo para administraciones secuenciales puede establecerse sin experimentación indebida.

Métodos de tratamiento

Se proporcionan en el presente documento métodos para tratar neoplasia en un sujeto. También se contemplan en el presente documento métodos para tratar una infección por patógenos u otra enfermedad infecciosa en un sujeto, tal como en un sujeto humano inmunocomprometido. Los procedimientos comprenden administrar un linfocito T, linfocito NK o linfocito CTL en una cantidad eficaz para conseguir el efecto deseado, sea este paliación de una afección existente o prevención de recurrencia. Para tratamiento, la cantidad administrada es una cantidad eficaz para producir el efecto deseado. Puede proporcionarse una cantidad eficaz en una o una serie de administraciones. Puede proporcionarse una cantidad eficaz en una embolada o por perfusión continua.

Una "cantidad eficaz" (o "cantidad terapéuticamente eficaz") es una cantidad suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado tras el tratamiento. Puede administrarse una cantidad eficaz a un sujeto en una o más dosis. Con respecto al tratamiento, una cantidad eficaz es una cantidad que sea suficiente para paliar, aliviar, estabilizar, invertir o ralentizar la progresión de la enfermedad o reducir de otro modo las consecuencias patológicas de la enfermedad. La cantidad eficaz la determina generalmente el médico caso por caso y está dentro de la experiencia de la técnica. Normalmente se tienen en cuenta varios factores cuando se determina una dosificación apropiada para conseguir una cantidad eficaz. Estos factores incluyen edad, sexo y peso del sujeto, la afección que se trate, la gravedad de la afección y la forma y concentración eficaz del fragmento de unión a antígeno administrado.

Para inmunoterapia adoptiva usando linfocitos T específicos de antígeno, se infunden normalmente dosis celulares en el intervalo de 10^9 . Tras la administración de las células modificadas genéticamente en el huésped y diferenciación posterior, se inducen linfocitos T que se dirigen específicamente contra el antígeno específico. La "inducción" de linfocitos T puede incluir inactivación de linfocitos T específicos de antígeno tal como por deleción o anergia. La inactivación es particularmente útil para establecer o restablecer la tolerancia tal como en trastornos autoinmunes. Las células modificadas pueden administrarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitación, por vía intravenosa, subcutánea, intranodal, intratumoral, intratecal, intrapleurales, intraperitoneal y directamente al timo.

Métodos terapéuticos

La divulgación proporciona métodos para aumentar una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite. En una realización, la divulgación proporciona pro para tratar o prevenir una neoplasia en un sujeto. La divulgación proporciona terapias que son particularmente útiles para el tratamiento de sujetos que tengan cáncer de próstata, o cáncer de próstata metastásico que no sea susceptible de intervenciones terapéuticas convencionales. Los sujetos humanos adecuados para terapia normalmente comprenden dos grupos de tratamiento que pueden distinguirse por criterios clínicos. Los sujetos con "enfermedad avanzada" o "alta carga tumoral" son los que portan un tumor clínicamente medible. Un tumor clínicamente medible es uno que puede detectarse basándose en la masa tumoral (por ejemplo, por palpación, exploración de TAC, monograma, mamograma o rayos X; los marcadores positivos bioquímicos o histopatológicos por sí solos son insuficientes para identificar esta población). Una composición farmacéutica abarcada en la presente divulgación se administra a estos sujetos para inducir una respuesta

antitumoral, con el objetivo de paliar su afección. Idealmente, se produce reducción de la masa tumoral como resultado, pero cualquier mejora clínica constituye un beneficio. La mejora clínica incluye reducción del riesgo o tasa de progresión o reducción de las consecuencias patológicas del tumor.

5 Un segundo grupo de sujetos adecuados se conoce en la técnica como los "grupos adyuvantes". Estos son individuos que han tenido un historial de neoplasia, pero que han respondido a otro modo de terapia. La terapia anterior puede haber incluido, pero no se restringe a, resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia tradicional. Como resultado, estos individuos no tienen tumor clínicamente medible. Sin embargo, son sospechosos de estar en riesgo de progresión de la enfermedad, cerca del sitio del tumor original o por metástasis. Este grupo puede subdividirse adicionalmente en individuos de alto riesgo y bajo riesgo. La subdivisión se realiza basándose en
10 características observadas antes o después del tratamiento inicial. Estas características se conocen en la técnica clínica, y están definidas de forma adecuada para cada neoplasia diferente. Son características típicas de subgrupos de alto riesgo en las que el tumor ha invadido tejidos colindantes o que muestran implicación de ganglios linfáticos.

Otro grupo tiene una predisposición genética a la neoplasia pero no ha mostrado aún señales clínicas de neoplasia. Por ejemplo, las mujeres que dan positivo para una mutación genética asociada con cáncer de mama, pero aún en edad de tener hijos, pueden desear recibir uno o más de los fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento en tratamiento de forma profiláctica para evitar la aparición de neoplasia hasta que sea adecuado realizar cirugía preventiva.
15

Los sujetos humanos con neoplasia que tienen cualquiera de las siguientes neoplasias: glioblastoma, melanoma, neuroblastoma, adenocarcinoma, glioma, sarcoma del tejido blando, y diversos carcinomas (incluyendo cáncer de próstata y de pulmón de células pequeñas) son sujetos especialmente apropiados. Los carcinomas adecuados incluyen además cualquiera conocido en el campo de la oncología, incluyendo, pero sin limitación, astrocitoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, oligodendroglioma, ependimoma, meduloblastoma, tumor ectodérmico neural primitivo (PNET), condrosarcoma, sarcoma osteogénico, adenocarcinoma pancreático ductal, adenocarcinomas de pulmón de células pequeñas y grandes, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma broncoalveolar, adenocarcinoma epitelial, y metástasis de hígado del mismo, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, hepatoma, colangiocarcinoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, carcinoma de células basales, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma papilar, carcinoma de glándulas sebáceas, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, tumor testicular, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de cadena pesada, tumores de mama tales como adenocarcinoma ductal y lobular, adenocarcinomas y carcinomas escamosos del cuello del útero, carcinomas epiteliales uterinos y ováricos, adenocarcinomas prostáticos, carcinoma de células escamosas transicional de la vejiga, linfomas de linfocitos B y T (nodular y difuso), plasmacitoma, leucemias agudas y crónicas, melanoma maligno, sarcomas de tejido blando y leiomyosarcomas.
20
25
30
35

Los sujetos pueden tener una forma avanzada de enfermedad, en cuyo caso el objetivo del tratamiento puede incluir mitigación o inversión de la progresión de enfermedad y/o alivio de los efectos secundarios. Los sujetos pueden tener un historial de la afección, para la que ya se han tratado, en cuyo caso el objetivo terapéutico normalmente incluirá una reducción o retardo del riesgo de reaparición.
40

En consecuencia, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una neoplasia en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno tumoral y un vector que codifica un ligando coestimulador. En una realización, la neoplasia se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama, y glioblastoma. En otra realización, el antígeno tumoral es antígeno de membrana específico de próstata, CD19, NY-ESO-1, WT-1 o hTERT.
45

En otro enfoque la divulgación proporciona un método para imponer tolerancia en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende un receptor que se une a un antígeno y un vector que codifica un ligando coestimulador. En una realización, este método previene o reduce una enfermedad autoinmune o una enfermedad asociada con trasplante alogénico.
50

Como consecuencia de la expresión en superficie constitutiva de ligandos coestimuladores, los linfocitos T o NK humanos transferidos de forma adoptiva están dotados de capacidades proliferativas, citolíticas y de supervivencia aumentadas en un tumor intrínsecamente poco inmunogénico o ambiente inmunodeficiente desprovisto de ligandos coestimuladores. Además, después de su localización en el tumor o infección viral y su proliferación, los linfocitos T que expresan ligando coestimulador convierten al tumor o sitio de infección viral en un ambiente altamente conductivo para una amplia serie de células inmunes implicadas en la fisiología antitumoral o respuesta antiviral (linfocitos que se infiltran en tumores, linfocitos NK, NKT, células dendríticas y macrófagos).
55

En otras realizaciones, la divulgación proporciona métodos para tratar sujetos con una infección por patógenos (por ejemplo, infección viral, infección bacteriana, infección fúngica, infección por parásitos o infección protozoaria). La

divulgación es particularmente útil para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto inmunocomprometido. Las infecciones virales a modo de ejemplo susceptibles de tratamiento usando un procedimiento de la divulgación incluyen, pero sin limitación, infecciones por Citomegalovirus (CMV), Virus de Epstein Barr (VEB), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y virus de la gripe.

- 5 En consecuencia, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una infección por patógenos en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de una célula inmunosensible como se describe en el presente documento.

Kits

10 La divulgación proporciona kits para el tratamiento o la prevención de una neoplasia, una infección por patógenos, un trastorno inmune o un trasplante alogénico. En una realización, el kit incluye una composición terapéutica o profiláctica que contiene una cantidad eficaz de una célula inmunosensible que comprende uno o más ligandos coestimuladores en forma farmacéutica unitaria. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente estéril que contiene una vacuna terapéutica o profiláctica; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, frascos, viales, tubos, bolsas, bolsillos, envases de blíster u otras formas de recipiente adecuadas conocidas en la técnica. Tales recipientes pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel laminado, hoja metálica, u otros materiales adecuados para contener medicamentos.

15 Si se desea, la célula inmunosensible se proporciona junto con instrucciones para administrar la célula a un sujeto que tenga o esté en riesgo de desarrollar una neoplasia, infección por patógenos, trastorno inmune o trasplante alogénico. Las instrucciones generalmente incluirán información acerca del uso de la composición para el tratamiento o prevención de neoplasia, infección por patógenos, trastorno inmune o trasplante alogénico. En otras realizaciones, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del agente terapéutico; programa de dosificación y administración para tratamiento o prevención de una neoplasia, infección por patógenos, trastorno inmune o trasplante alogénico o síntomas de los mismos; precauciones; advertencias; indicaciones; contraindicaciones; información acerca de sobredosis; reacciones adversas; farmacología animal; estudios clínicos y/o referencias. Las instrucciones pueden imprimirse directamente sobre el recipiente (cuando esté presente), o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como una hoja separada, panfleto, tarjeta o carpeta proporcionada en o con el recipiente.

20 Se conocen bien en la técnica procedimientos recombinantes. La práctica emplea, a no ser que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (Wei y Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller y Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel y col., eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis y col., eds., 1994); y "Current Protocols in Immunology" (Coligan y col., eds., 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptido y, como tales, pueden considerarse en la realización y la práctica de la invención. Se analizan técnicas particularmente útiles en las secciones a continuación.

Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos se proporcionan como una descripción adicional de la invención y para ilustrar pero no limitar la invención.

Ejemplo 1

45 **Los linfocitos T que coexpresan CD80 y 4-1BBL inducen respuestas proliferativas robustas después de estimulaciones cíclicas a través de su receptor de linfocitos T endógeno o a través de un receptor de antígeno quimérico sin coestimulación proporcionada por células presentadoras de antígenos (APC)**

Para evaluar si la expresión constitutiva de ligandos coestimuladores en linfocitos T podría sustituir a la coestimulación mediada por APC, las respuestas de linfocitos T de linfocitos T primarios humanos se investigaron en primer lugar en tres sistemas experimentales. Usando activación de linfocitos T mediada por anti-CD3 (OKT3), se cuantificó la expansión de linfocitos T de sangre periférica transducidos con CD80 y 4-1BBL (Figura 1a), que se compararon con linfocitos T transducidos con cada ligando por sí solo o ninguno. La estimulación de receptores de linfocitos T (TCR) recurrente sola en ausencia de ligandos coestimuladores no consiguió expandir linfocitos T e indujo rápidamente una reducción del número de linfocitos T después de la primera reestimulación (Figura 1b). En claro contraste, los linfocitos T CD80⁺ 4-1BBL⁺ estimulados con OKT3 desencadenaron una proliferación media mayor de 237 veces durante 21 días. En comparación, los linfocitos T transducidos con cada ligando por sí solo mostraron una proliferación reducida de media 8,1 veces (p < 0,0001). Basándose en estas observaciones, el concepto de coestimulación mediada por linfocitos T se extendió a dos aplicaciones clínicamente relevantes de terapia de linfocitos T adoptiva, usando linfocitos T donadores de memoria específicos de citomegalovirus (CMV) y linfocitos T autólogos genéticamente redirigidos específicos de antígeno de diferenciación. Los linfocitos T

específicos de pp65 de CMV expandidos previamente en APC²⁴ artificiales HLA-A*0201⁺pp65⁺ se transdujeron fácilmente con CD80 y 4-1BBL (Figura 1c). Después de exposición a la línea celular de tumor colónico Caco-2 transducida con pp65 HLA-A*0201⁺, los linfocitos T equipados con el par de ligandos coestimuladores CD80 y 4-1BBL mostraron una expansión significativamente mayor (209 veces, $p < 0,0001$), en comparación con un número de linfocitos T en reducción continua en los grupos de control (Figura 1d).

Para generar rápidamente linfocitos T humanos sensibles a tumores, se transdujeron mediante retrovirus linfocitos T de sangre periférica con el receptor de antígeno quimérico PzI (Gade y col., Cancer Res. 65: 9080-9088, 2005), un receptor de antígeno no restringido a HLA específico para el antígeno tumoral PSMA. El receptor PzI comprende un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla de unión a PSMA fusionado con el dominio de señalización ξ de CD3 humano y es análogo en estructura con otros receptores de antígeno quimérico actualmente en uso en ensayos clínicos. Los linfocitos T PzI⁺ que coexpresaban CD80 y 4-1BBL (Figura 1e) montaron una respuesta proliferativa robusta después de tres estimulaciones semanales con células LNCaP PSMA⁺, CD80⁺, CD86⁻, 4-1BBL⁻ (enriquecimiento medio 1042 veces, Figura 1f panel superior). Esta expansión fue 9 veces mayor ($p < 0,0001$) que la obtenida cuando se expresaba CD80 y 4-1 BBL en las células tumorales en lugar de en los linfocitos T (Figura 1f panel inferior). Análisis adicionales documentaron la mayor inducción de IL-2 e IFN- γ por exposición a PSMA en linfocitos T que coexpresaban CD80 y 4-1BBL, así como su mayor potencial citolítico específico de antígeno y susceptibilidad reducida a apoptosis, en comparación con linfocitos T estimulados de forma convencional (datos no mostrados). En estudios paralelos, se investigaron otros miembros de la familia de ligando de TNF⁵, incluyendo OX40L, CD27L (CD70) o CD30L, con o sin CD80 y se descubrió que la combinación de CD80 y 4-1BBL era la más potente (datos no mostrados).

En conjunto, estos estudios *in vitro* demuestran la capacidad de los linfocitos T que coexpresan CD80 y 4-1BBL para potenciar en gran medida la activación de TCR subóptima y, además, para suplir la falta de coestimulación proporcionada por las APC.

Ejemplo 2

Los linfocitos T que coexpresan CD80 y 4-1BBL erradican tumores sistémicos establecidos.

Para investigar la potencia de los linfocitos T CD80⁺4-1BBL⁺ de los inventores *in vivo*, se desarrolló un modelo de cáncer de próstata establecido, multifocal, utilizando células tumorales PC-3 PSMA⁺ (Gong y col., Neoplasia 1: 123-7, 1999). Usando bioluminiscencia de modalidad dual y captura de imágenes por resonancia magnética, se visualizaron tumores cuatro semanas después de la inoculación intravenosa, antes de iniciar la terapia con linfocitos T adoptiva. Los pulmones, los ganglios linfáticos cervicales, la médula ósea y el hígado se identificaron como los sitios principales de enfermedad (Figura 2a). En este modelo, los animales se trataron cuatro semanas después de la inoculación tumoral con una infusión intravenosa única de 8×10^6 linfocitos T dirigidos a PSMA, que expresaban CD80, 4-1BBL, ambos, o ninguno.

En ratones de control tratados con 8×10^6 linfocitos T dirigidos a CD 19, que, como los linfocitos T no transducidos, no consiguieron lisar dianas tumorales PSMA⁺, la carga tumoral *in vitro* progresó de forma estable hasta que los ratones tuvieron que sacrificarse (Figura 2b,c). El tratamiento con linfocitos T PzI⁺ dio como resultado una reducción a corto plazo de la carga tumoral, seguido de progresión tumoral terminal (Figura 2b), produciendo una modesta ventaja de supervivencia de 12 días ($p = 0,0001$, Figura 2c). La expresión constitutiva de bien CD80 o bien 4-1BBL solo en linfocitos T dirigidos a PSMA aumentó de forma solamente marginal esta respuesta terapéutica, extendiendo la mediana de supervivencia a 63 y 66 días, respectivamente ($p = 0,077$, $p = 0,056$, respectivamente). Los linfocitos T que coexpresaban CD80 y 4-1BBL indujeron respuestas mayores y redujeron la carga tumoral 3,3 veces ($p = 0,0028$) cuatro días después de la transferencia de linfocitos T adoptiva. Se obtuvo una reducción de 1375 veces después de dieciséis días, en relación con el grupo de tratamiento de linfocitos T PzI⁺ ($p = 0,0002$). Siete de diez animales tratados permanecieron sin tumores 200 días después de la infusión de linfocitos T PzI⁺CD80⁺4-1BBL⁺ y ninguno en todos los demás grupos de tratamiento o de control (Figura 2c). Los tres ratones que no respondieron a terapia inicialmente mostraron regresión tumoral notable antes de recaer (Figura 2b) y sobrevivieron durante 100 días (Figura 2c).

Ejemplo 3

La expansión de linfocitos T *in vivo* es robusta y específica de antígeno.

Para rastrear y cuantificar *in vivo* la migración y acumulación de linfocitos T en relación con la localización tumoral y carga tumoral, se marcaron adicionalmente linfocitos T transferidos de forma adoptiva con luciferasa Roja de Elatéridos (Ponomarev y col., Eur J Nucl Med Mol Imaging. Mayo 2004; 31(5): 740-51) (CBR-luc, Figura 3a). La captura de imágenes en serie de ratones tratados con linfocitos T PzI⁺ mostró un aumento progresivo de la señal que alcanzó un pico cuatro días después de la inyección de linfocitos T (Figura 3b). Una señal de bajo nivel permaneció detectable hasta el día 18. En el caso de linfocitos T PzI⁺CD80⁺4-1BBL⁺, la señal pico se detectó el día 8 (recuento de fotones más bajo 41 veces mayor que linfocitos T PzI⁺, $p = 0,0009$), que se siguió de una reducción de señal gradual, aunque aún pudo detectarse bioluminiscencia hasta el día 100 en algunos animales (Figura 3b). Resulta importante que el efecto de la coexpresión de CD80 y 4-1BBL se anuló en linfocitos T 19zI⁺ (Figura 3b), lo

que es coherente con la necesidad de estimulación por antígenos para que se produzca la expansión. Los análisis citométricos de flujo y los recuentos de linfocitos T de suspensiones de célula única de pulmón en tres ratones tratados por grupo determinaron que el número real de linfocitos T era altamente concordante con intensidades de señal bioluminiscentes adquiridas (Figura 3c, d). Estos estudios, por lo tanto, demuestran que los linfocitos T que coexpresan CD80 y 4-1BBL se expanden de una manera dependiente de antígeno antes de entrar con el tiempo en una fase de contracción que da como resultado eliminación de linfocitos T sustancial, si no completa.

Ejemplo 4

Coalescencia de los ligandos coestimuladores CD80 y 4-1BBL con sus receptores respectivos CD28 y 4-1BB en la sinapsis inmunológica que precede a la autoestimulación de linfocitos T funcionales.

Para abordar si los ligandos coestimuladores expresados de forma constitutiva activan linfocitos T en cis, se examinó en primer lugar la cuestión de si estos ligandos se colocalizan con sus receptores afines durante la activación de linfocitos T. Tanto CD28 como 4-1BB amplifican la señalización de receptores de linfocitos T (TCR) después del reclutamiento a los compartimentos de membrana central de la sinapsis inmunológica³¹⁻³³. Por lo tanto, la colocalización de CD80 y 4-1BBL en el área de contacto de linfocitos T con células tumorales es probablemente un prerrequisito para autoestimulación. Para visualizar la distribución de 4-1BBL por microscopia confocal, el dominio citoplasmático se fusionó con dsRed monomérico y esta proteína se coexpresó con CD80 en linfocitos T CD8⁺ transducidos con Pzl. Inmediatamente antes de mezclar con células LNCaP CD28⁻, 4-1BB⁻ no modificadas, los linfocitos T se marcaron con subunidad β de toxina del cólera conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-CTB) para visualizar grupos de balsas lipídicas después de la formación de sinapsis. Después de la interacción con el tumor LNCaP, 4-1BBL y CD80, así como 4-1BB y CD28, se movilaron a las áreas de contacto de células tumorales-linfocitos T positivas para toxina del cólera-FITC (Figura 4a, b). Para investigar la consecuencia funcional de esta interacción, se examinó y se cuantificó la colocalización de Granzima B (GRB). La condensación de GRB definida, aunque dispersa, se localizó cerca de la zona de contacto en grupos de linfocitos T CD8⁺ que expresaban Pzl y sus dianas tumorales afines (Figura 4c, d). La mediana de reclutamiento de GRB a puntos de unión de células tumorales con linfocitos T se amplificó 2,2 veces en linfocitos T CD80⁺4-1BBL⁺ ($p = 0,0001$). Para confirmar que estas diferencias observadas eran de hecho un resultado de la interacción de 4-1BB con 4-1BBL dentro de la misma célula, la expresión de 4-1BB se suprimió por coexpresión estable de ARNph específico de 4-1BBL y 4-1BB (datos no mostrados). La supresión de 4-1BB redujo significativamente la densidad de GRB cerca de la sinapsis (reducción de 2,02 veces, $p < 0,0001$), a pesar de la presencia de 4-1BBL en el punto de unión de los linfocitos T en todos los grupos celulares de los que se capturaron imágenes. Estos hallazgos sugieren fuertemente que el ligando coestimulador interacciona funcionalmente con su receptor en la misma superficie de linfocitos T después de coalescencia inducida por antígenos en la sinapsis inmunológica.

Para demostrar además la autoestimulación, se elaboró un ensayo de célula única en el que la interacción de 4-1BB/4-1BBL endógena podría analizarse después de la expresión más temprana de 4-1BBL en linfocitos T recientemente transducidos. Para conseguir esto, se expresó en primer lugar luciferasa de luciérnaga bajo el control transcripcional de NF- κ B, un efector corriente abajo clave de la señalización de 4-1BB, en un clon de linfocitos T de Jurkat CD3⁺CD28⁺4-1BB⁻ (JNL). Para impedir la inducción de NF- κ B por coestimulación de testigo esporádica, las células JNL se expusieron a vectores retrovirales que codificaban 4-1BB, 4-1BBL y CD80, y se subclonaron limitando la dilución 4 horas después, bastante antes de la primera expresión génica de superficie detectable (datos no mostrados), y se estimuló inmediatamente por OKT3 unido a placa. Como se ilustran en la Figura 4e, los linfocitos T CD80⁺CD28⁺4-1BBL⁺4-1BB⁺ aislados regularon positivamente de forma notable NF- κ B, a diferencia de células JNL transducidas con vector de control. La señal de luminiscencia se adquirió en 36 pocillos que contenían una única célula transducida múltiples veces como se describe en Procedimientos. La coexpresión de los dos pares de ligandos aumentó la señal dependiente de NF- κ B 3,8 veces (en relación con el JNL de control; $p < 0,0001$; Figura 4f). Puesto que en cualquier punto de este ensayo la única fuente de ligandos coestimuladores fue la propia superficie de los linfocitos T aislados, esta regulación positiva de NF- κ B solo podría reflejar el impacto de la autoestimulación.

Ejemplo 5

Coestimulación *trans in vitro* de linfocitos T testigos específicos de antígeno

La expresión constitutiva de ligandos coestimuladores también puede permitir que los linfocitos T modificados genéticamente coestimulen linfocitos T en *trans*. Notablemente, se observaron ocasionalmente grupos de tres células comprendidos por linfocitos T CD80⁺4-1BBL⁺ y CD80⁻4-1BBL⁻ en los estudios confocales mostrados en la Figura 4 (Figura 5a). Para proporcionar pruebas funcionales de coestimulación en *trans*, se elaboró un sistema de cultivo conjunto en el que se mezclaron linfocitos T específicos de PSMA que expresaban CD80 y 4-1BBL con linfocitos T marcados con carboxifluoresceín succinimidil éster (CFSE) que no se transdujeron con CD80 o 4-1BBL. Se descubrió que estos linfocitos T específicos de pp65 de CMV, marcados con CFSE se coestimulaban eficazmente por linfocitos T autólogos testigos Pzl⁺CD80⁺4-1BBL⁺ (Figura 5b, c). El contacto físico entre las dos poblaciones de linfocitos T era un prerrequisito para que los linfocitos T citotóxicos sensibles a CMV se expandieran, ya que su separación por una membrana de transwell redujo en gran medida la inducción fuerte de GRB y la expansión de linfocitos T robusta montada en células sensibles a pp65, lo que es coherente con un mecanismo

dependiente de contacto celular (Figura 5d).

Ejemplo 6

Coestimulación en trans *in vivo* de linfocitos T que se infiltran en tumores

5 Estas observaciones impulsaron a los inventores a investigar si la estimulación en trans mediada por linfocitos T es operativa *in vivo*. Para este fin, se combinaron dos modelos animales previamente descritos: el modelo de tumor RM1-PSMA en el que los tumores están confinados a los pulmones (Gade y col., Cancer Res. 65: 9080-9088, 2005), y el modelo de tumor Raji, en el que las células tumorales colonizan selectivamente médula ósea (Brentjens y col., Nat Med. Marzo 2003; 9(3): 279-86). Todos los ratones se trataron con linfocitos T transducidos con PzI, que también expresaban CBR-luc (Figura 3). Posteriormente se infundieron en los animales linfocitos T PzI⁺ negativos para luciferasa, que expresaban o carecían de CD80 y 4-1BBL. La expresión de luciferasa de Gaussia (Gau-Luc) en las células tumorales y de CBR-luc en linfocitos T PzI⁺, permitió el uso de captura de imágenes por bioluminiscencia dual para supervisar simultáneamente progresión tumoral y la acumulación espacial y temporal de linfocitos T. Se observaron distribuciones tisulares y señales bioluminiscentes de linfocitos CBR-luc⁺ comparables seis horas (día 0) después de la transferencia adoptiva en todos los grupos de tratamiento (Figura 6a). El día 2, el efecto de los linfocitos T PzI⁺CD80⁺4-1BBL⁺ en linfocitos T CBR-luc⁺PzI⁺ aún era modesto (mediana de 1,2 veces, en relación con linfocitos T PzI⁺ como testigos, $p = 0,0947$). La señal de CBR-luc se redujo posteriormente en ratones a los que se proporcionaron linfocitos T PzI⁺ de control (Figura 6a). Por el contrario, este recuento de fotones registrado sobre el área torácica aumentó 6,5 veces en promedio en ratones a los que se proporcionaron linfocitos T PzI⁺CD80⁺4-1BBL⁺ ($p = 0,0122$, Figura 6a, b). Resulta importante que este efecto era selectivo para los linfocitos T dirigidos a PSMA, puesto que los linfocitos T transducidos con 19zI CBR-luc⁺ coinyectados, que se infiltraron en los tumores de Raji establecidos en ambos fémures, no aumentaron significativamente la señal bioluminiscente torácica en ningún punto temporal (mediana de aumento de 1,5 veces el día 4, $p = 0,0947$, Figura 6a, b). Colectivamente, estos datos *in vitro* e *in vivo* indican que los linfocitos T CD80⁺4-1BBL⁺ potencial localmente las respuestas de linfocitos T proporcionando coestimulación en *trans*.

25 La presentación constitutiva de CD80 en linfocitos T actúa como un ligando coestimulador para CD28 pero también podría interactuar con reguladores negativos de la expansión de linfocitos T, tales como CTLA-4 con altas afinidades (Hodi y col. Clin Cancer Res. 15 Sep 2007: 13: 5238-42). Para evitar la autoinhibición de linfocitos T terapéuticamente indeseable mediada por CD80 expresado en linfocitos T, los linfocitos T se cotransdujeron con el receptor de antígeno quimérico P28z (Maher y col. Nature Biotechnology, Vol 20, Ene 2002, P 70-75) y 4-1BBL expresado en la superficie de linfocitos T (Figura 7). El receptor de fusión dual P28z contiene restos de señalización tanto TCR como CD28. Mientras que la señalización a través de P28z no consiguió provocar una expansión de linfocitos T prolongada, la coexpresión de 4-1 BBL potenció notablemente la respuesta proliferativa más de 10 veces el día 14. La señal coestimuladora de CD80-4-1BBL sinérgica, sin embargo, era aún más fuerte cuando ambos ligandos de longitud completa se expresaron en la superficie de linfocitos T transducidos con PzI (aproximadamente dos veces mayor que P28z + 4-1BBL, Figura 7). Las señales de CD28 transmitidas por un elemento de señalización de CD28 fusionado en la construcción del receptor de antígeno quimérico puede por lo tanto dotar a los linfocitos T PzI⁺4-1BBL⁺ de propiedades proliferativas potenciadas, aunque no es una proliferación de linfocitos T tan robusta como la observada en linfocitos T PzI⁺4-1BBL⁺CD80⁺.

40 Un objetivo principal de la inmunoterapia de cáncer es proporcionar coestimulación segura y eficaz para linfocitos T sensibles a tumores. Usando un enfoque genético, se demostró que los linfocitos T en sí mismos proporcionan coestimulación potente. La expresión constitutiva de ligandos coestimuladores en células específicas para CMV primarias humanas y linfocitos T dirigidos a PSMA no solamente compensó la ausencia de estos ligandos en APC, sino que también indujo una respuesta proliferativa que superaba la inducida por APC convencionales (Figura 1). El estudio de un panel de ligandos coestimuladores indicó que CD80 y 4-1BBL proporcionaban la activación de linfocitos T más fuerte bajo las condiciones experimentales de los inventores, permitiendo expansión de linfocitos T robusta después de estimulación antigénica semanal repetida. Los linfocitos T CD80⁺4-1BBL⁺ mostraron proliferación, secreción de citocinas, supervivencia *in vitro* y expansión y persistencia *in vivo* superior, dando como resultado una biomasa de linfocitos T de 40 a 50 veces mayor una semana después de la infusión en ratones portadores de tumores, en comparación con linfocitos T específicos de PSMA que no se transdujeron con CD80 y 4-1BBL (Figura 3). Mientras que los animales tratados con linfocitos T específicos de PSMA no transducidos con CD80/4-1BBL sucumbieron uniformemente a la enfermedad, la infusión de los mismos linfocitos T convertidos en CD80⁺4-1BBL⁺ rechazó eficazmente tumores PC-3 sistémicos establecidos en la mayoría de los ratones tratados (Figura 2). Estos hallazgos, obtenidos en un modelo de tumor muy difícil, subrayan la actividad biológica y potencia notable de la expresión a alto nivel, constitutiva, de ligandos coestimuladores en linfocitos T.

55 Para investigar el mecanismo que subyace a esta respuesta potenciada, se examinó en primer lugar la distribución espacial de CD80 y 4-1BBL y sus receptores en linfocitos T antes y después de interacción con tumores. Se ha mostrado que CD28 y 4-1BB se acumulan en proximidad cercana al TCR dentro del grupo de activación supramolecular central de la sinapsis inmunológicas. Los ligandos coestimuladores expresados por APC, incluyendo CD80 CD40L y CD70, polarizan la sinapsis, apoyando la noción de que la sinapsis inmunológica proporciona un área de contacto ordenada para facilitar y propagar las interacciones receptor-ligando coestimulador. De forma coherente con este modelo, CD80 y 4-1BBL codificados por linfocitos T se polarizan hacia la zona de

contacto entre linfocitos T y células tumorales LNCaP junto con CD28 y 4-1BB (Figura 4). La consecuencia funcional de esta colocación se ilustra por la acumulación de GRB, que se transporta hacia la interfaz de linfocito T-APC a lo largo de microtúbulos después del contacto antigénico en sinapsis que contienen focos 4-1BB⁺4-1BBL⁺ pero no en linfocitos T que carecen de 4-1BB (Figura 4). La sinapsis inmunológica está por lo tanto aparentemente bien adaptada para orquestar la autoestimulación.

La autoestimulación se demostró en un ensayo de una única célula en el que se visualizó la expresión *de novo* de 4-1BB y 4-1BBL en NF-κB activado por linfocitos T recientemente traducidos sin ninguna posible contribución de un linfocito T cercano. La expresión de NF-κB se visualizó en tiempo real, después de la separación física de clones únicos poco después de la transducción, varias horas antes de que pudiera detectarse la expresión de ligando coestimulador (Figura 4). La autoestimulación puede por lo tanto permitir que los linfocitos T anulen la escasa capacidad coestimuladora de APC subóptimas, incluyendo células tumorales. Además, la expresión constitutiva en superficie celular de 4-1BBL en linfocitos T asegura la coestimulación "bajo demanda" asegurando que el ligando permanezca listo para interactuar con receptores regulados positivamente de forma transitoria tales como 4-1BB. Se podría especular que la interacción física de 4-1BBL con su receptor puede producirse durante reorganización de balsa temprana o entre plegamientos de membrana plasmática opuestos en el centro de la sinapsis. Este efecto parece estar autorregulado ya que la expansión de linfocitos T CD80⁺4-1BBL⁺ se atenuó gradualmente en respuesta a exposición a antígeno *in vitro* repetida (Figura 1). La expansión de linfocitos T *in vivo* también estuvo autolimitada (Figura 3), lo que puede deberse a eliminación tumoral que priva a los linfocitos T de estimulación antigénica y señalización coestimuladora atenuada.

Sin desear quedar ligado a la teoría, los estudios de los inventores también apoyan la coestimulación en trans como un mecanismo para potenciar la inmunidad a través de la expresión de alto nivel de CD80 y 4-1BBL en linfocitos T. Las funciones proliferativa y efectora de los linfocitos T que interactúan con antígeno presentado por APC en ausencia de CD80 o 4-1BBL se amplificaron de este modo por un cocultivo *in vitro* o coadministración *in vivo* de linfocitos T que presentan ambos ligandos. La mezcla de células *in vitro* y estudios de transwell indicaron que la coestimulación en trans requería contacto célula-célula (Figura 5), de acuerdo con los efectos en trans indicados para otros tipos celulares tales como fibroblastos o células tumorales testigos. La coestimulación en trans también se indujo *in vivo*, de forma específica de órgano, como se ilustra en ratones que portan dos tumores diferentes que segregan a diferentes sitios (Figura 6).

La coestimulación en trans mediada por linfocitos T allana el camino para nuevos y emocionantes enfoques terapéuticos puesto que la coestimulación puede suministrarse a linfocitos T cercanos dentro del microambiente tumoral. Esta característica es especialmente valiosa porque las células dendríticas frecuentemente son incapaces de regular positivamente completamente los ligandos coestimuladores dentro del microambiente tumoral. Aunque los factores solubles tales como interleucina 2 pueden contribuir a ayuda de linfocitos T, la dependencia del contacto célula-célula restringe eficazmente la coestimulación en trans a otros linfocitos T que se infiltran en tumores. Sin desear quedar ligado a la teoría, el efecto de la competición de linfocitos T en la frecuencia *in vivo* de la coestimulación en trans puede en última instancia ampliar la respuesta inmunitaria antitumoral mediante el reclutamiento de una población diversa de linfocitos que se infiltran en tumores endógenos y de este modo ayudar a prevenir el escape de antígenos tumorales.

En resumen, se mostró que la expresión de CD80 y 4-1BBL en linfocitos T humanos es un medio biológicamente eficaz para evitar la falta de coestimulación mediada por APC convencional en el microambiente tumoral. Este enfoque es aplicable a linfocitos T activados a través de un receptor de antígeno transducido así como su TCR endógeno. La coestimulación mediada por linfocitos T, bien en auto, trans o ambos, puede por lo tanto ser útil en una amplia serie de tumores malignos y enfermedades infecciosas que se tratan por terapia de linfocitos T adoptiva.

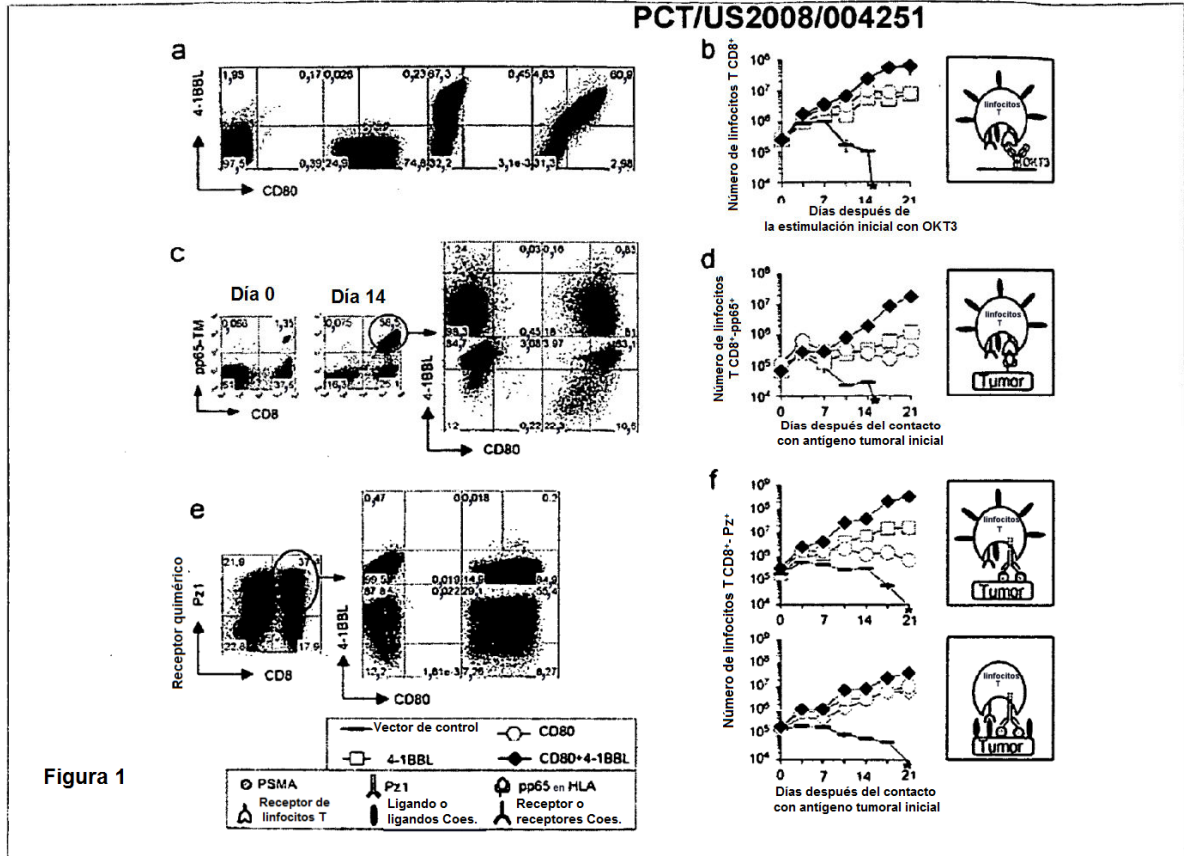
Realizaciones de la invención

A partir de la descripción anterior, resultará evidente que pueden realizarse variaciones y modificaciones a la invención descrita en el presente documento para adaptarla a diversos usos y condiciones. Tales realizaciones también están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

La enumeración de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en el presente documento incluye definiciones de esa variable como cualquier elemento único o combinación (o subcombinación) de elementos enumerados. La enumeración de una realización en el presente documento incluye esa realización como una realización única o en combinación con cualquier otra realización o partes de la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un linfocito T que comprende un receptor que se une a un antígeno y a ligandos coestimuladores exógenos 4-1BBL y CD80.
2. El linfocito T de la reivindicación 1, en el que el ligando coestimulador se expresa de forma constitutiva o inducible.
- 5 3. El linfocito T de la reivindicación 1, en el que la célula se selecciona del grupo que consiste en un linfocito Citolítico Natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL) y un linfocito T regulador, y en el que el antígeno es un antígeno tumoral o de patógeno.
4. El linfocito T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno carcinoembrionario (CEA), IL13R alfa, her-2, CD19, NY-ESO-1, HIV-1 Gag, Lewis Y, Mart-1, gp100, tirosinasa, WT-1, hTERT y mesotelina.
- 10 5. El linfocito T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, expresando el linfocito T un receptor de antígeno recombinante o endógeno que es Pz1 o P28z.
6. El linfocito T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, comprendiendo además el linfocito T un ligando coestimulador exógeno seleccionado del grupo que consiste en OX40L, CD70, LIGHT, CD30L y CD86.
- 15 7. El linfocito T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que un receptor de antígeno endógeno o recombinante o un complejo presentador de antígenos se expresa de forma constitutiva en la superficie del linfocito T.
8. El linfocito T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el ligando coestimulador 4-1BBL o el ligando coestimulador CD80 se expresa de forma constitutiva en la superficie del linfocito T.
- 20 9. El linfocito T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el ligando coestimulador 4-1BBL o el ligando coestimulador CD80 se expresa en un vector retroviral.
10. Un linfocito T específico de virus o un linfocito T específico de antígeno tumoral que comprende un vector de expresión que codifica un polipéptido de 4-1BBL y un polipéptido de CD80.
- 25 11. El linfocito T específico de virus de la reivindicación 10, en el que el linfocito T reconoce un virus seleccionado del grupo que consiste en citomegalovirus (CMV), virus de Epstein Barr (VEB), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y antígenos del virus de la gripe.
12. El linfocito T específico de virus o el linfocito T específico de antígeno tumoral de la reivindicación 10, en el que el vector de expresión codifica además un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en OX40L, CD70 y CD30L.
- 30 13. El linfocito T específico de virus o el linfocito T específico de antígeno tumoral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el vector de expresión es un vector retroviral.
14. Un kit para el tratamiento de una neoplasia, una infección por patógeno, un trastorno autoinmune o un trasplante alogénico, en el que el kit comprende i) un linfocito T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o ii) un linfocito T específico de virus o un linfocito T específico de antígeno tumoral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-13 y comprendiendo el kit además instrucciones para su uso.
- 35



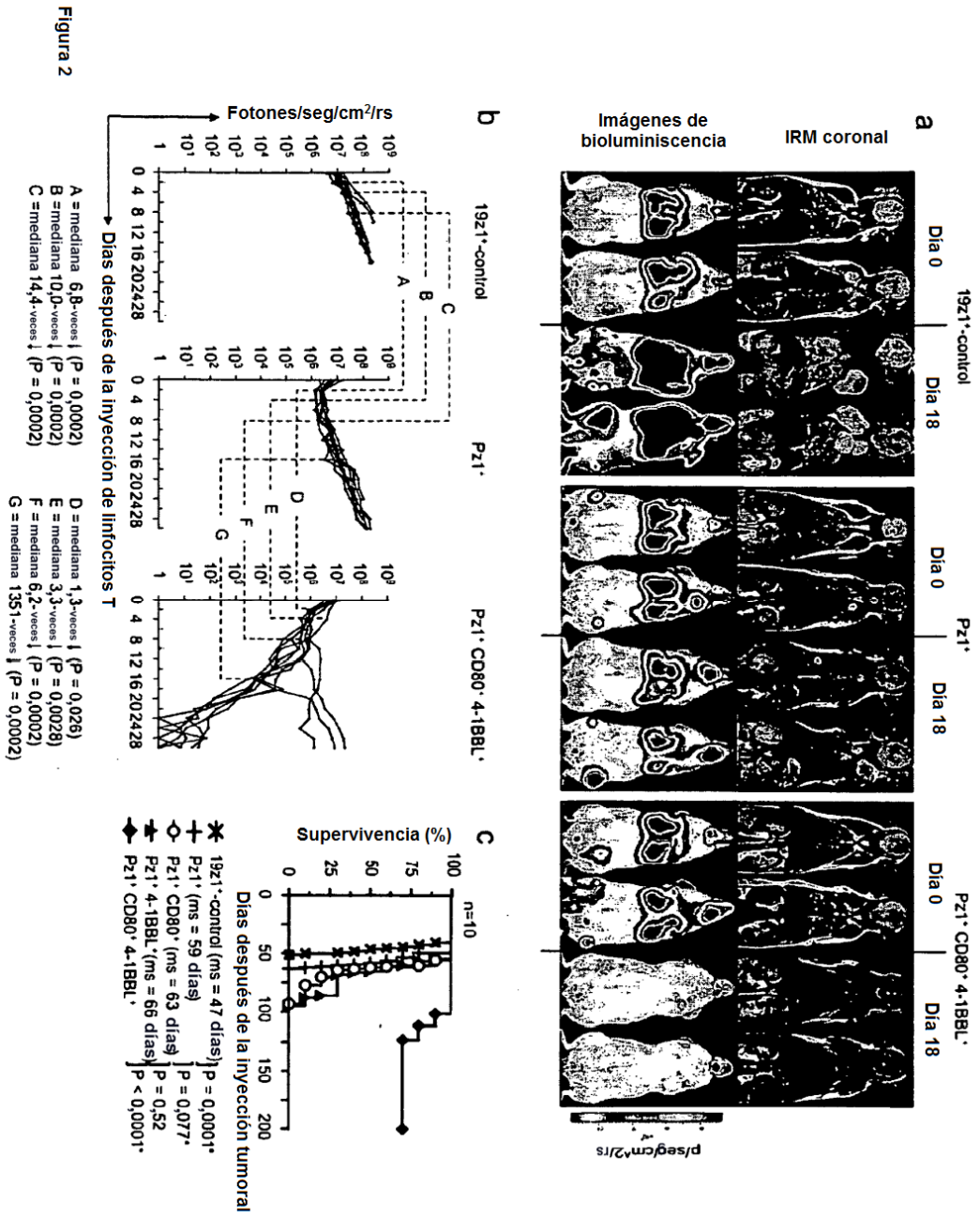
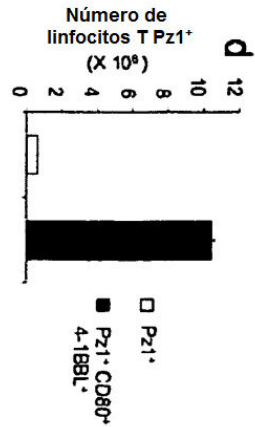
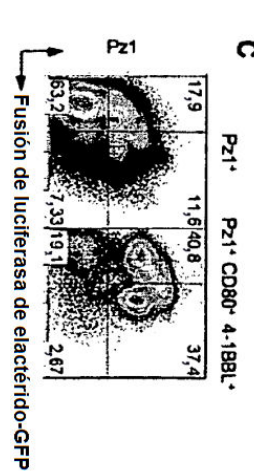
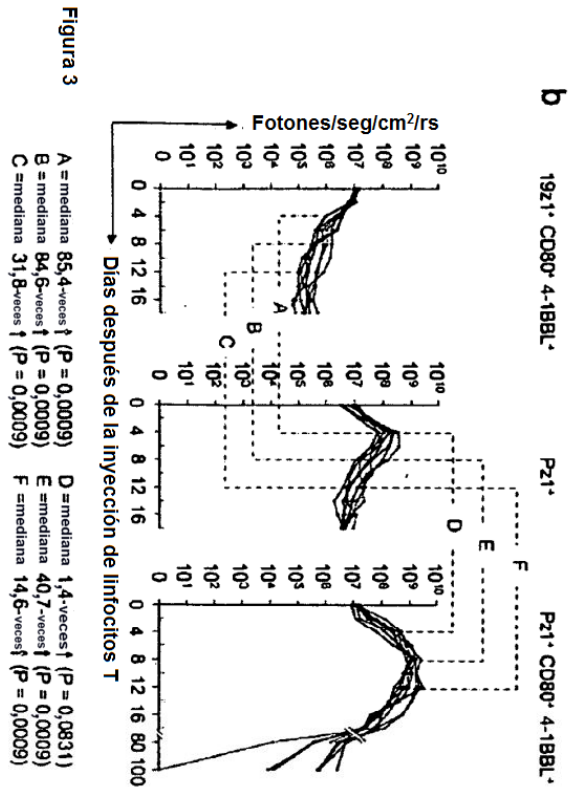
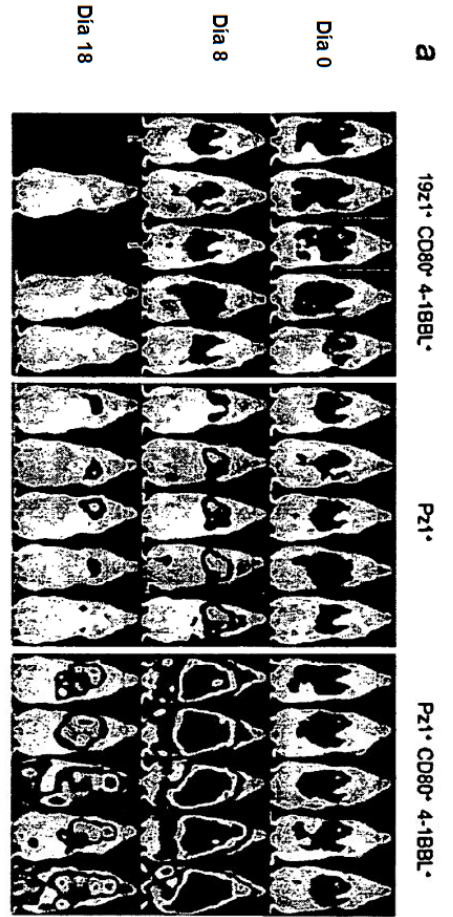


Figura 2



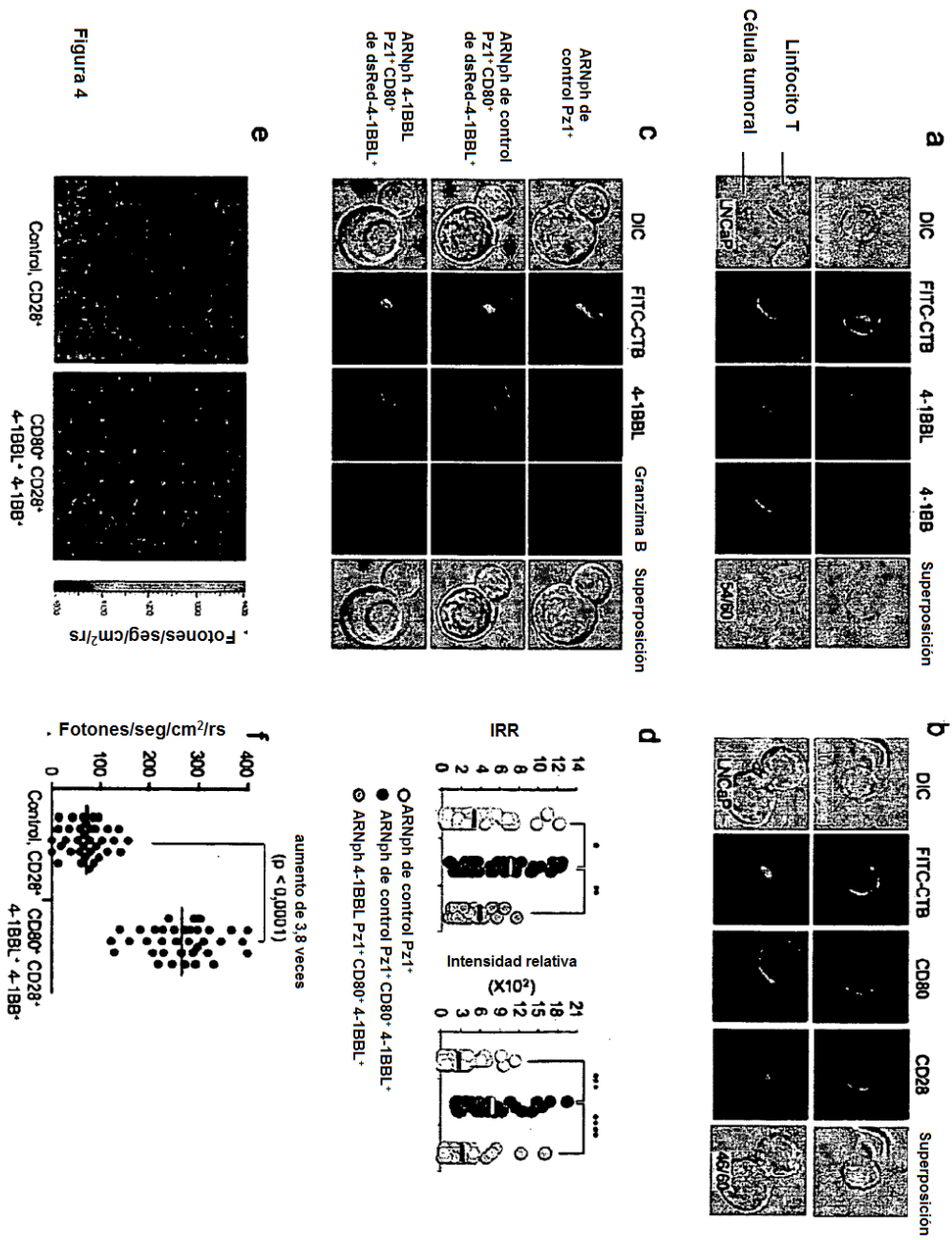


Figura 4

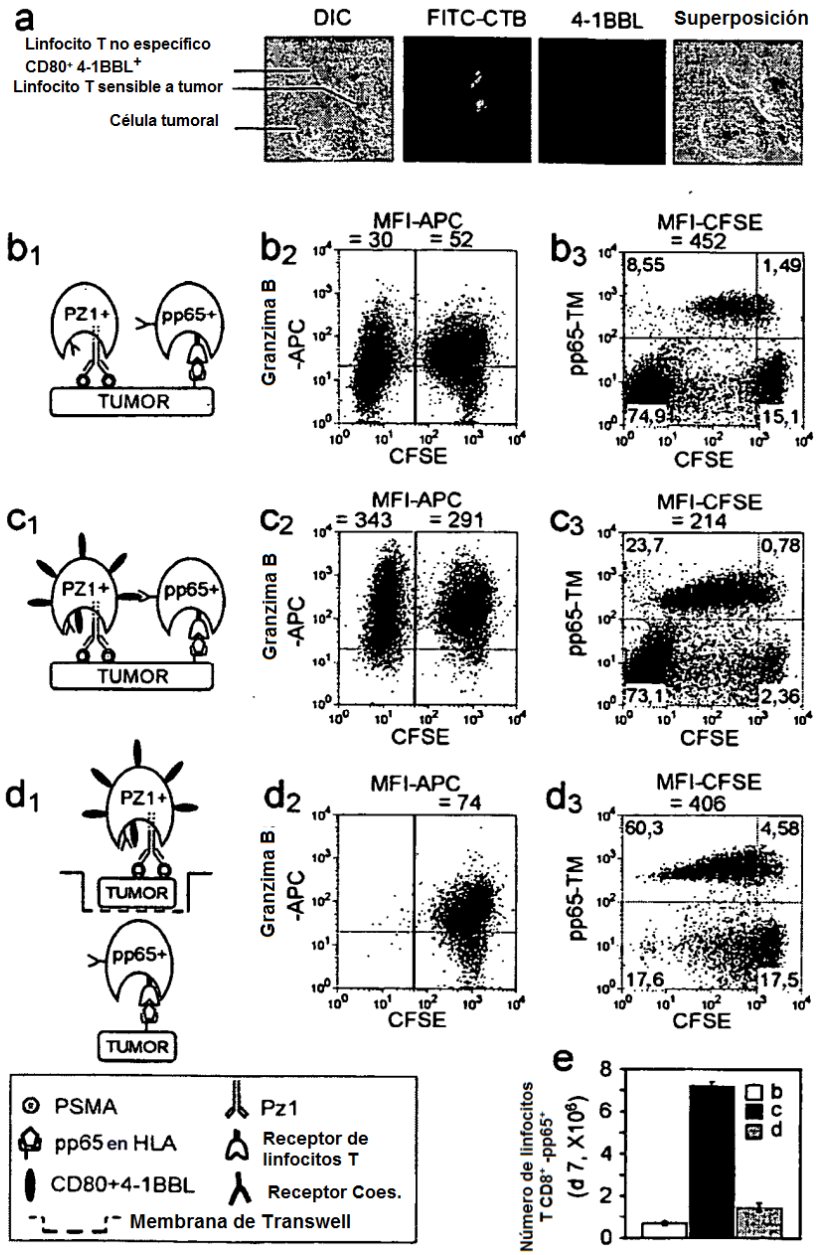


Figura 5

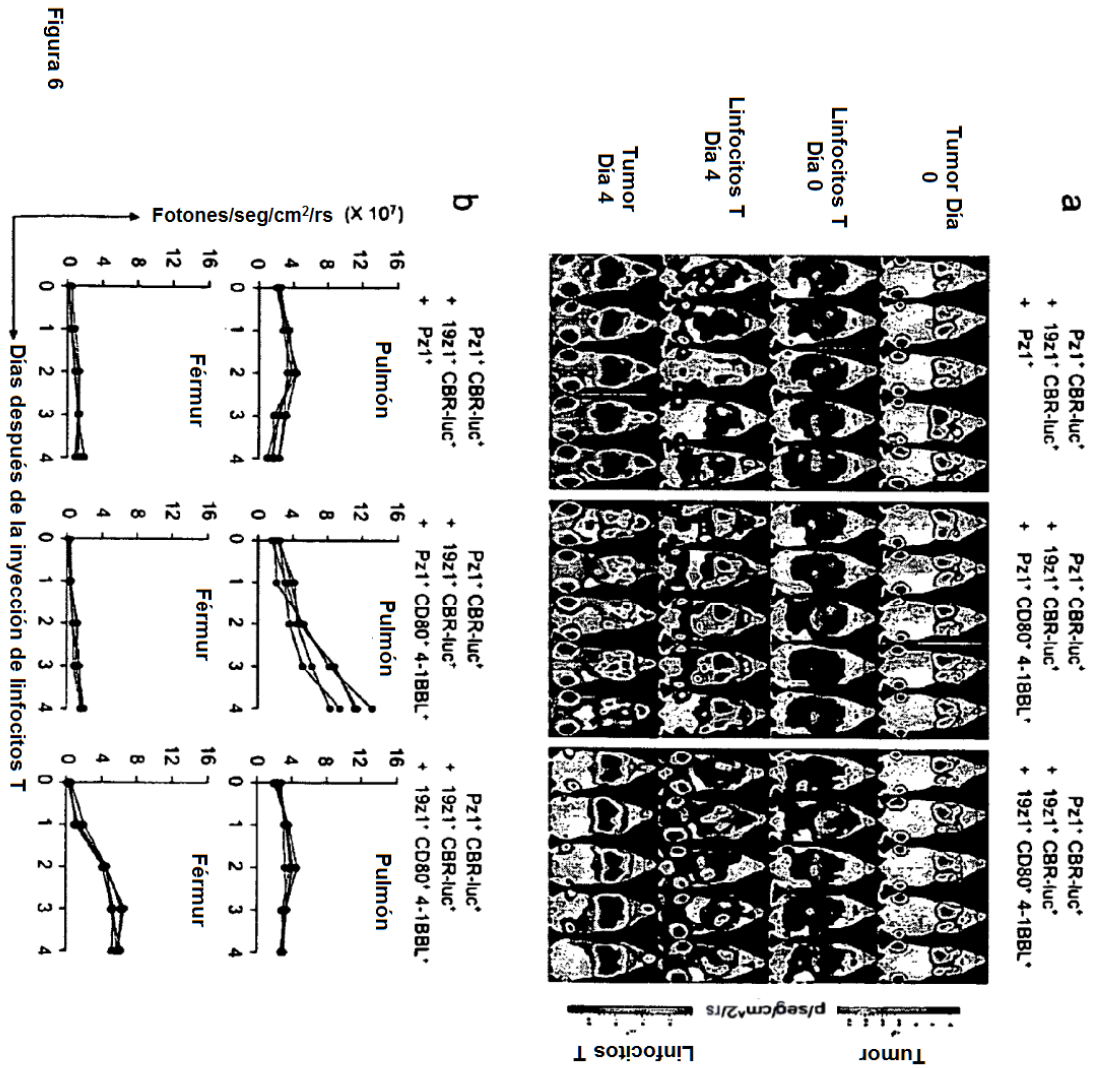


Figura 6

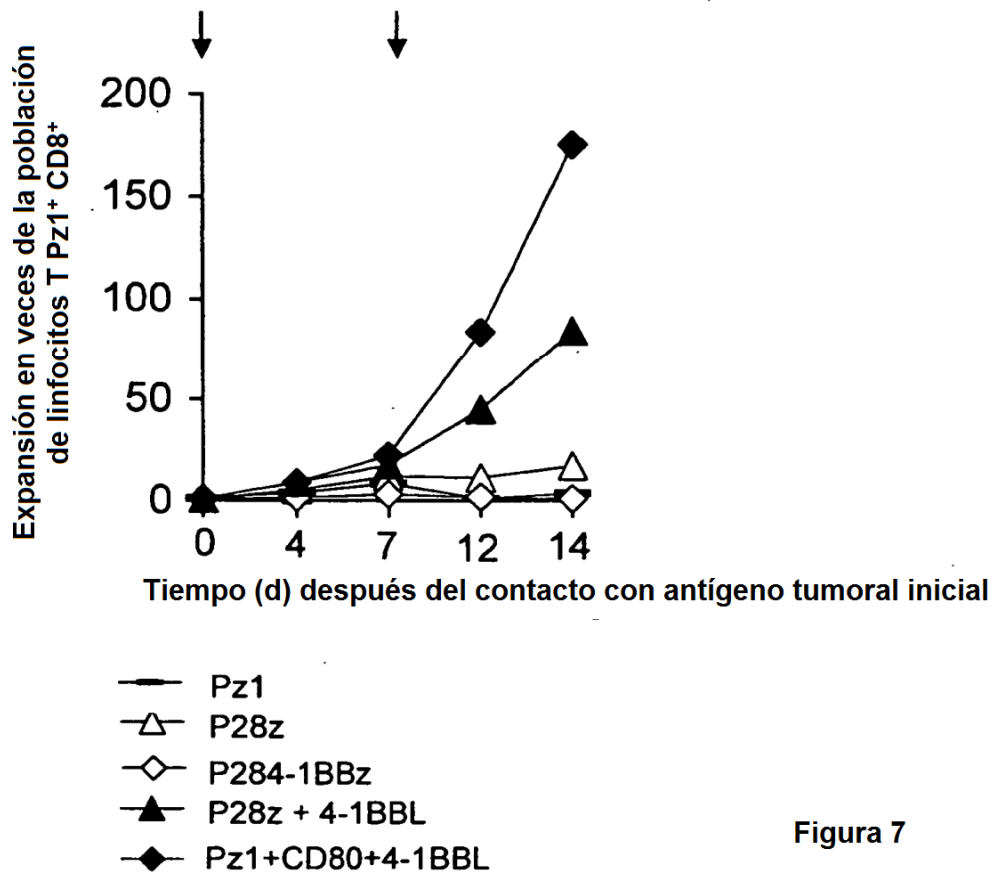

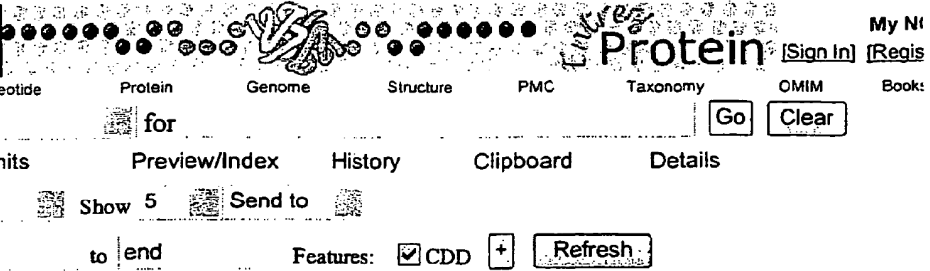


Figura 7

[PubMed](#) [Nucleotide](#) [Protein](#) [Genome](#) [Structure](#) [PMC](#) [Taxonomy](#) [OMIM](#) [Book](#)

Search

Display

Range: from to **Features:** CDD

1: [NP_005182](#). Reports CD80 antigen prec...[gi:4885123]

[BLink](#), [Conserved Domains](#), [Links](#)

[Comment](#) [Features](#) [Sequence](#)

LOCUS NP_005182 288 aa lineal PRI 24-FEB-2008
DEFINICIÓN Precursor de antígeno CD80 [Homo sapiens]
REFERENCIA NP_005182
VERSIÓN NP_005182.1 GI:4885123
FUENTE DB REFSEQ: referencia [NM_005191.3](#)
PALABRAS CLAVE
FUENTE Homo sapiens (ser humano)
ORGANISMO Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCIA 1 (restos 1 a 288)
AUTORES Nolan,A., Weiden.M., Kelly, A., Hoshino,Y., Hoshino,S., Mehta.N. y Gold,J.A.
TÍTULO CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis
PUBLICACIÓN Am. J. Respir. Crit. Care Med. 177 (3), 301-308 (2008)
PUBMED [17989345](#)
OBSERVACIÓN **GenerIF:** la expresión de CD80 se reguló positivamente en los monocitos en circulación en sujetos sépticos el día 1

REFERENCIA 2 (restos 1 a 288)
AUTORES Stephan,M.T., Ponomarev,V., Brentjens,R.J., Chang,A.H., Dobrenkov,K.V., Heller,G. y Sadelain,M.
TÍTULO T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection
PUBLICACIÓN Nat. Med. 13 (12), 1440-1449 (2007)
PUBMED [18026115](#).
OBSERVACIÓN **GenerIF:** CD80 y 4-1BBL inducen auto y transcoestimulación en células tumorales

REFERENCIA 3 (restos 1 a 288)
AUTORES Habib-Agahi,M., Phan,T.T. y Searle,P.F.
TÍTULO Co-stimulation with 4-1BB ligand allows extended T-cell proliferation, synergizes with CD80/CD86 and can reactivate anergic T cells
PUBLICACIÓN Int. Immunol. 19 (12), 1383-1394 (2007)
PUBMED [17977894](#)
OBSERVACIÓN **GenerIF:** Los linfocitos T que se habían vuelto no sensibles a anti-CD3 podrían reactivarse para proliferar cuando se coestimulan con 4-1BBL, solo o combinado con CD80-CD86

REFERENCIA 4 (restos 1 a 288)
AUTORES Kakoulidou,M., Giscombe.R., Zhao.X., Lefvert,A.K. y Wang,X.
TÍTULO Human Soluble CD80 is generated by alternative splicing, and

ES 2 398 760 T3

recombinant soluble CD80 binds to CD28 and CD152 influencing T-cell activation

PUBLICACIÓN Scand. J. Immunol. 66 (5), 529-537 (2007)
 PUBMED [17953528](#)

OBSERVACIÓN GeneRIF: sCD80 en suero humano añade un nuevo miembro a la familia de receptores solubles, lo que implica una red de factores coestimuladores solubles con relevancia funcional

REFERENCIA 5 (restos 1 a 288)

AUTORES Dopheide,J.F., Sester,U., Schlitt,A., Horstick,G., Rupprecht,H.J., Munzel.T. y Blankenberg,S.

TÍTULO Monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease show an increased expression of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 in vitro

PUBLICACIÓN Coron. Artery Dis. 18 (7), 523-531 (2007)
 PUBMED [17925605](#)

OBSERVACIÓN GeneRIF: CD40, CD80 y CD86 se regula positivamente en células dendríticas derivadas de monocitos cultivados de pacientes con enfermedad de las arterias coronarias

REFERENCIA 6 (restos 1 a 288)

AUTORES Weiskirchen,R., Pino,J.D., Macalma.T., Bister,K. y Beckerle,M.C.

TÍTULO The cysteine-rich protein family of highly related LIM domain proteins

PUBLICACIÓN J. Biol. Chem. 270 (48), 28946-28954 (1995)
 PUBMED [7499425](#)

REFERENCIA 7 (restos 1 a 288)

AUTORES Freeman,G.J., Distech,C.M. , Gribben,J.G., Adler,D.A., Freedman,A.S., Dougery,J. y Nadler,L.M.

TÍTULO The gene for B7, a costimulatory signal for T-cell activation, maps to chromosomal region 3q13.3-3q21

PUBLICACIÓN Blood 79 (2), 489-494 (1992)
 PUBMED [1370389](#)

REFERENCIA 8 (restos 1 a 288)

AUTORES Selvakumar,A. , Mohanraj,B.K., Eddy,R.L., Shows,T.B., White,P.C. y Dupont,B.

TÍTULO Genomic organization and chromosomal location of the human gene encoding the B-lymphocyte activation antigen B7

PUBLICACIÓN Immunogenetics 36 (3), 175-181 (1992)
 PUBMED [1377173](#)

REFERENCIA 9 (restos 1 a 288)

AUTORES Freeman,G.J. , Gray,G.S., Gimmi,C.D., Lombard,D.B., Zhou,L.J., White,M., Fingeroth,J.D., Gribben,J.G. y Nadler,L.M.

TÍTULO Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7

PUBLICACIÓN J. Exp. Med. 174 (3), 625-631 (1991)
 PUBMED [1714935](#)

REFERENCIA 10 (restos 1 a 288)

AUTORES Freeman,G.J., Freedman,A.S., Segil,J.M., Lee,G., Whitman,J.F. y Nadler.L.M.

TÍTULO B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells

PUBLICACIÓN J. Immunol. 143 (8), 2714-2722 (1989)
 PUBMED [2794510](#)

COMENTARIO REFSEQ VALIDADO: Este registro ha experimentado validación o revisión preliminar. La secuencia de referencia derivó de [BP225173.1](#), [BC042665.1](#) y [AC073352.22](#).
 Sumario: El antígeno de activación de linfocitos B B7-1 (denominado anteriormente B7) proporciona señales reguladoras para linfocitos T como consecuencia de unión con los ligandos CD28 (MIM 186760) y CTLA4 (MIM 123890) de linfocitos T [proporcionado por OMIM].

ES 2 398 760 T3

Nota de Publicación: Este registro de RefSeq incluye un subconjunto de las publicaciones que están disponibles para este gen. Por favor, véase el registro de Entrez Gene para acceder a publicaciones adicionales

```

ELEMENTOS      Localización/Calificadores
source         1..288
               /organism="Homo sapiens"
               /db_xref="taxón:9606"
               /chromosome=" 3"
               /map="3q13.3-q21"
Protein        1..288
               /product="Precursor de antígeno CD80"
               /note="variante de molécula coestimuladora IgV-CD80; antígeno
               CD80 (ligando de antígeno CD28 1, antígeno B7-1); factor
               coestimulador CD80; antígeno de activación de linfocitos B B7"
sig_peptide    1..34
               /calculated_mol_wt=3754
               35..288
mat_peptide    /product="antígeno CD80"
               /calculated_mol_wt=29312
Region         37..139
               /region_name="IG"
               /note="Inmunoglobulina; smart00409"
               /db_xref="CDD:47718"
Region         37..135
               /region_name="conjunto V"
               /note="Dominio de conjunto V de inmunoglobulina. Este dominio
               se encuentra en anticuerpos así como en proteína neural P0 y
               CTL4 entre otras; pfam07686"
               /db_xref="CDD:87333"
Region         143..227
               /region_name="conjunto C2_2"
               /note="Dominio de inmunoglobulina de conjunto de C2 de tipo
               CD80. Estos dominios pertenecen a la superfamilia de
               inmunoglobulina; pfam08205"
               /db_xref="CDD:71639"
CDS            1..288
               /gene="CD80"
               /coded_by="NM_005191.3:396..1262"
               /db_xref="CCDS:CCDS2989.1"
               /db_xref="GenelD:941"
               /db_xref="HGNC:1700"
               /db_xref="HPRD:00202"
               /db_xref="MIM:112203"

```



ORIGEN

```

 1 mghtrrqtgs pskcpylnff qlvlaglsf fcsghvhtk evkevatlsc ghnvsveela
61 qtirywqkek kmvltmmsgd mniwpeyknr tifditnnls ivilalrpsd egtyecvvlk
121 yekdafkreh laevtlsvka dfptpsisdf eiptsnirri icstsggfpe phlswleng
181 elnainttvs qdpetelyav sskldfnmtt nhsfmcliky ghrlrvnqtfn wnttkqehfp
241 dnllpswait lisvngifvi ccltycfapr crerrrnerl rresvrpv

```

//



My N[...]
[Sign In] [Regis...]

[PubMed](#) [Nucleotide](#) [Protein](#) [Genome](#) [Structure](#) [PMC](#) [Taxonomy](#) [OMIM](#) [Books](#)

Search for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display

Range: from to Features: CDD

1: [P41273](#). Reports Tumor necrosis fa...[gi:728739]

[BLink](#), [Conserved Domains](#), [Links](#)

[Comment](#) [Features](#) [Sequence](#)

LOCUS DEFINICIÓN REFERENCIA VERSIÓN FUENTE DB PALABRAS CLAVE FUENTE ORGANISMO REFERENCIA AUTORES TÍTULO PUBLICACIÓN PUBMED OBSERVACIÓN REFERENCIA AUTORES	P41273 254 aa lineal PRI 04-DIC-2007 Miembro de la superfamilia del ligando de factor de necrosis tumoral 9 (ligando de 4-1BB) (4-1BBL). P41273 P41273.1 GI:728739 swissprot: locus TNFL9_HUMAN, referencia P41273 ; clase: convencional. referencias extra:Q2M3S2 creado: 1 de febrero de 1995. secuencia actualizada: 1 de febrero de 1995. anotación actualizada: 4 de diciembre de 2007. xrefs: U03398.1 , AAA53134.1 , BC104805.1 , AAI04806.1 , BC104807.1 , AAI04808.1 , 138427 xrefs (bases de datos no de secuencia): RefSeq: NP_003802.1 , UniGene: Hs.1524 , DIP:DIP:3020N, Ensembl: ENSG00000125657 , GeneID:8744, KEGG:hsa: 8744, H-InvDB:HIX0040144, HGNC:11939, MIM:606182, PharmGKB:PA36629, ArrayExpress:P41273, CleanEx:HS_TNFSF9, GermOnline:ENSG00000125657, GO:0005102, GO:0006915, GO:0008283, GO:0007267, GO:0007165, InterPr Pfam: PF00229 , SMART: SM00207 , PROSITE: PS00251 , PROSITE: PS50049 Citocina; membrana; polimorfismo; anclaje de señal; transmembrana Homo sapiens (ser humano) Homo sapiens Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo. 1 (restos 1 a 254) Alderson.M.R., Smith,C.A., Tough,T.W., Davis-Smith,T., Armitage.R.J., Falk,B., Roux.E., Baker,E., Sutherland,G.R., Din.W.S. y Goodwin,R.G. Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand Eur. J. Immunol. 24 (9), 2219-2227 (1994) 8088337 SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNM]. 2 (restos 1 a 254) Gerhard,D.S., Wagner,L., Feingold,E.A., Shenmen.C.M., Grouse,L.H., Schuler,G., Klein,S.L., Old,S., Rasooly,R., Good,P., Guyer,M., Peck,A.M., Derge,J.G., Lipman,D., Collins,F.S., Jang,W., Sherry,S., Feolo,M., Misquitta,L., Lee.E., Rotmistrovsky,K., Greenhut,S.F., Schaefer,C.F., Buetow,K., Bonner,T.I., Haussler,D., Kent,J., Kiekhuis,M., Furey,T., Brent,M., Prange,C, Schreiber,K.,
--	---

ES 2 398 760 T3

Shapiro,N., Bhat,N.K., Hopkins,R.F., Hsie,F., Driscoll,T., Soares,M.B., Casavant,T.L., Scheetz,T.E., Brown-stein,M.J., Usdin,T.B., Toshiyuki,S., Carninci,P., Piao,Y., Dudekula,D.B., Ko,M.S., Kawakami,K-, Suzuki,Y., Sugano,S., Gruber,C.E., Smith,M.R., Simmons/B., Moore,T., Waterman,R., Johnson,S.L., Ruan,Y., Wei.C.L., Mathavan,S., Gunaratne.P.H., Wu,J., Garcia,A.M., Hulyk,S.W., Fuh,E., Yuan,Y., Sneed.A., Kowis.C., Hodgson,A., Muzny,D.M., McPherson,J., Gibbs,R.A., Fahey,J., Helton,E., Ketteman,M., Madan,A., Rodrigues,S., Sanchez,A., Whiting,M., Madari,A., Young,A.C., Wetherby.K.D., Granite,S.J., Kwong,P.N., Brinkley,C.P., Pearson,R.L., Bouffard.G.G., Blakesly,R.W., Green,E.D., Dickson,M.C., Rodriguez,A.C., Grimwood,J., Schmutz,J., Myers,R.M., Butterfield,Y.S., Griffith,M., Griffith,O.L., Krzywinski,M.I., Liao,N., Morin,R., Palmquist,D., Petrescu,A.S., Skalska,U., Smailus,D.E., Stott,J.M., Schnerch,A., Schein,J.E., Jones,S.J., Holt,R.A., Baross.A., Marra,M.A., Clifton,S., Makowski,K.A., Bosak.S. y Malek,J.

CONSRTM
TÍTULO MGC Project Team
The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)

PUBLICACIÓN
PUBMED Genome Res. 14 (10B), 2121-2127 (2004)
15489334

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNM A GRAN ESCALA].
TEJIDO = Pulmón
Errata:[Genome Res. Jun 2006;16(6):804. Morrin, Ryan [corregido a Morin, Ryan]]

COMENTARIO En o antes de 16 de febrero de 2007 esta versión de secuencia reemplazó
gi:[121941506](#), gi:[7512264](#).
[FUNCIÓN] Citocina que se une a TNFRSF9. Induce la proliferación de linfocitos T en sangre periférica activados. Puede tener un papel en la muerte celular inducida por activación (AICD). Puede desempeñar un papel en interacciones afines entre linfocitos T y linfocitos B/macrófagos.
[SUBUNIDAD] Homotrímico (Potencial).
[LOCALIZACIÓN SUBCELULAR] Membrana; proteína de membrana de tipo II de pase único
[ESPECIFICIDAD TISULAR] Expresado en cerebro, placenta, pulmón, músculo esquelético y riñón.
[SIMILITUD] Pertenece a la familia de factor de necrosis tumoral.

ELEMENTOS
source Localización/Calificadores
1..254
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxón:9606"

gene 1..254
/gene="TNFSF9"

Protein 1..254
/gene="TNFSF9"
/product="miembro de la superfamilia de ligando de factor de necrosis tumoral 9"

Region 1..254
/gene="TNFSF9"
/region_name="Cadena madura"
/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
/note="Miembro de la superfamilia de ligando de factor necrosis tumoral 9".
/FTId=PRO_0000185501."

Region 1. .28
/gene="TNFSF9"
/region_name="Dominio topológico"
/inference = "pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"

ES 2 398 760 T3

```

Region      /note = "Citoplásmico (Potencial)."  

17  

/gene="TNFSF9"  

/region_name="Variante"  

/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles  

adicionales"  

/note="P -> A (in dbSNP:rs442511). /FTId=VAR_011928."  

Region      29..49  

/gene="TNFSF9"  

/regi on_name="Región transmembrana"  

/inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles  

adicionales"  

/note="Anclaje de señal para proteína de membrana de tipo II  

(Potencial)."  

Region      35..41  

/gene="TNFSF9"  

/region_name="Región con preferencia composicional"  

/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles  

adicionales"  

/note="Poli-Leu."  

Region      50..254  

/gene="TNFSF9"  

/region_name="Dominio topológico"  

/inference= "pruebas no experimentales, no se registraron  

detalles adicionales"  

/note="Extracelular (Potencial)."  

Region      91. .238  

/gene="TNFSF9"  

/region_name="TNF"  

/note="Factor de necrosis tumoral; los miembros de la  

superfamilia de TNF incluyen las citocinas: TNF (TNF-alfa), LT  

(linfotoxina-alfa, TNF-beta), ligando de CD40, Apo2L (TRAIL),  

ligando de Fas y ligando de osteoprotegerina (OPG); cd00184"  

/db_xref="CDD:29146"  

Site        order(94,142,144,199,204,234,238)  

/gene="TNFSF9"  

/site_type="otro"  

/note="interfaz de trímero"  

/db_xref="CDD:29146"  

Site        order(110..111,116,162,169,176)  

/gene="TNFSF9"  

/site_type="otro"  

/note="sitios de unión a receptor"  

/db_xref="CDD:29146"  

ORIGEN      .  

1 meyasdasld peapwppapr aracrvlpwa lvagl11111 laaacavfla cpwavsgara  

61 spgsaasprl regpelspdd paglldlrqg mfaqlvaqnv llidgplswy sdpplagvsl  


121 tgglsykedt kelvvakagv yyvffqlelr rvvagegsgs vs1alhlqpl rsaagaaala  

181 ltvd1ppass earnsafgfq grllhlsagq rlgvhlhtea rarhawqltq gatvlg1frv  

241 tpeipag1ps prse  

//

```


My N [Sign In] [Regis]

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books

Search for

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display

Range: from to Features:

1: [BAB18304](#). Reports OX40 ligand [Homo...[gi:11275538] BLink, Links



[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS BAB18304 67 aa lineal PRI 19-OCT-2004
 DEFINICIÓN ligando de OX40 [Homo sapiens].
 REFERENCIA BAB18304
 VERSIÓN BAB18304.1 GI:11275538
 FUENTE DB referencia [AB042988.2](#)
 PALABRAS CLAVE
 FUENTE Homo sapiens (ser humano)
 ORGANISMO [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCIA 1
 AUTORES Hikami,K., Tsuchiya,N. y Tokunaga,K.
 TÍTULO New variations in human OX40 ligand (CD134L) gene
 PUBLICACIÓN Genes Immun. 1 (8), 521-522 (2000)
 PUBMED 11197696
 REFERENCIA 2 (restos 1 a 67)
 AUTORES Hikami.K., Tsuchiya, N. y Tokunaga.K.
 TÍTULO Presentación directa
 PUBLICACIÓN Presentado (19 de mayo de 2000) Koki Hikami, Universidad de Tokio, Departamento de Genética Humana; 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokio 113-0033, Japón (E-mail:kokihikami@mail.goo.ne.jp, Tel:81-3-5841-3693, Fax:81-3-5802-8619)

ELEMENTOS Localización/Calificadores
 source 1..67
 /organism="Homo sapiens"
 /db.xref="taxón:9606"
 /chromosome="1"
 /map="lq25"
 Protein 1..67
 /product="ligando de OX40"
 CDS 1..67
 /gene="OX40L"
 /coded_by="join(AB042988.2:55..207,AB042988.2:462..510)"

ORIGEN
 1 mervqpleen vgnaarprfe rnklllvasv igglglllcf tyiclhfsal qvshryprig
 61 sikvqft
 //



My NI [\[Sign In\]](#) [\[Regis\]](#)

[PubMed](#) [Nucleotide](#) [Protein](#) [Genome](#) [Structure](#) [PMC](#) [Taxonomy](#) [OMIM](#) [Books](#)

Search for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display [GenPept](#) 5

Range: from to Features: CDD

1: [NP_001243](#). Reports tumor necrosis fa...[gi:4507605]

[BLink](#), [Conserved Domains](#), [Links](#)

Comment	Features	Sequence
LOCUS	NP_001243	193 aa lineal PRI 11-FEB-2008
DEFINICIÓN	superfamilia del ligando de factor de necrosis tumoral, miembro 7 [Homo sapiens].	
REFERENCIA	NP_001243	
VERSIÓN	NP_001243.1 GI:4507605	
FUENTE DB	REFSEQ: referencia NM_001252.3	
PALABRAS CLAVE		
FUENTE	Homo sapiens (ser humano)	
ORGANISMO	Homo sapiens Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.	
REFERENCIA	1 (restos 1 a 193)	
AUTORES	Yang,Z.Z., Novak,A.J., Ziesmer,S.C., Witzig,T.E. y Ansell,S.M.	
TÍTULO	CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells	
PUBLICACIÓN	Blood 110 (7), 2537-2544 (2007)	
PUBMED	17615291	
OBSERVACIÓN	GeneRIF: revela un nuevo papel para linfocitos B de linfoma no de Hodgkin en el desarrollo de linfocitos T reguladores intratumorales	
REFERENCIA	2 (restos 1 a 193)	
AUTORES	van Oosterwijk,M.F., Juwana,H., Arens,R., Tesselaar.K., van Oers,M.H., Eldering,E. y van Lier,R.A.	
TÍTULO	CD27-CD70 interactions sensitise naive CD4+ T cells for IL-12-induced Th1 cell development	
PUBLICACIÓN	Int. Immunol. 19 (6), 713-718 (2007)	
PUBMED	17548342	
OBSERVACIÓN	GeneRIF: Las interacciones CD27-CD70 pueden promover la formación de linfocitos Th1 permitiendo que los linfocitos T vírgenes respondan a señales de diferenciación y promoviendo la supervivencia de linfocitos T efectores activados.	
REFERENCIA	3 (restos 1 a 193)	
AUTORES	Diegmann,J., Junker,K., Loncarevic,I.F., Michel,S., Schimmel,B. y von Eggeling,F.	
TÍTULO	Immune escape for renal cell carcinoma: CD70 mediates apoptosis in lymphocytes	
PUBLICACIÓN	Neoplasia 8 (11), 933-938 (2006)	
PUBMED	17132225	
OBSERVACIÓN	GeneRIF: La apoptosis mediada por exposición al CD70 secretado por células tumorales puede contribuir a la incapacidad de pacientes con carcinoma de células renales para desarrollar una respuesta antitumoral mediada por linfocitos eficaz	
REFERENCIA	4 (restos 1 a 193)	
AUTORES	Adam,P.J., Terrett,J.A., Steers,G., Stockwin,L., Loader,J.A.,	

ES 2 398 760 T3

Fletcher,G.C., Lu,L.S., Leach,B.I., Mason,S., Stamps,A.C.,
Boyd,R.S., Pezzella,F., Gatter,K.C. y Harris,A.L.

TÍTULO CD70 (TNFSF7) is expressed at high prevalence in renal cell
carcinomas and is rapidly internalised on antibody binding

PUBLICACIÓN Br. J. Cancer 95 (3), 298-306 (2006)

PUBMED [16892042](#)

OBSERVACIÓN GeneRIF: El análisis inmunocitoquímico demostró que la unión de un
anticuerpo anti-CD70 con CD70(TNFSF7), expresado de forma endógena
en la superficie de líneas celulares A498 y 786-O dio como resultado
la rápida internalización del complejo anticuerpo-receptor.

REFERENCIA 5 (restos 1 a 193)

AUTORES Huang,J., Kerstann,K.W., Ahmadzadeh,M., Li,Y.F., El-Gamil,M.,
Rosenberg,S.A. y Robbins.P.F.

TÍTULO Modulation by IL-2 of CD70 and CD27 expression on CD8+ T cells:
importance for the therapeutic effectiveness of cell transfer
immunotherapy

PUBLICACIÓN J. Immunol. 176 (12), 7726-7735 (2006)

PUBMED [16751420](#)

OBSERVACIÓN GeneRIF: Interacción de CD70 con CD27 desempeña un papel directo en
la activación de linfocitos T mediada por IL-2.

REFERENCIA 6 (restos 1 a 193)

AUTORES Kobata, T., Jacquot,S., Kozlowski,S., Agematsu,K., Schlossman,S.F.
y Morimoto,C.

TÍTULO CD27-CD70 interactions regulate B-cell activation by T cells

PUBLICACIÓN Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (24), 11249-11253 (1995)

PUBMED [7479974](#)

REFERENCIA 7 (restos 1 a 193)

AUTORES Brown, G.R., Meek,K., Nishioka,Y. y Thiele.D.L.

TÍTULO CD27-CD27 ligand/CD70 interactions enhance alloantigen-induced
proliferation and cytolytic activity in CD8+ T lymphocytes

PUBLICACIÓN J. Immunol. 154 (8), 3686-3695 (1995)

PUBMED [7706711](#)

REFERENCIA 8 (restos 1 a 193)

AUTORES Hintzen,R.Q., Lens,S.M., Koopman,G., Pals.S.T., Spits,H. y van
Lier,R.A.

TÍTULO CD70 represents the human ligand for CD27

PUBLICACIÓN Int. Immunol. 6 (3), 477-480 (1994)

PUBMED [8186199](#)

REFERENCIA 9 (restos 1 a 193)

AUTORES Hintzen,R.Q., Lens,S.M., Beckmann,M.P., Goodwin,R.G., Lynch,D. y
van Lier,R.A.

TÍTULO Characterization of the human CD27 ligand, a novel member of the
TNF gene family

PUBLICACIÓN J. Immunol. 152 (4), 1762-1773 (1994)

PUBMED 8120385

REFERENCIA 10 (restos 1 a 193)

AUTORES Bowman,M.R., Crimmins,M.A. , Yetz-Aldape,J., Kriz,R., Kelleher,K.
y Herrmann,S.

TÍTULO The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27

PUBLICACIÓN J. Immunol. 152 (4), 1756-1761 (1994)

PUBMED 8120384

COMENTARIO REFSEQ REVISADO: Este registro se ha revisado por el personal de
NCBI. La secuencia de referencia derivó de [AC008760.7](#).

Sumario: La proteína codificada por este gen es una citocina que pertenece a la familia del ligando de factor de necrosis tumoral (TNF). Esta citocina es un ligando para TNFRSF27/CD27. Es un antígeno de superficie en linfocitos T y B activados, pero no en reposo. Induce proliferación de linfocitos T coestimulados, potencia la generación de linfocitos T citolíticos y contribuye a la activación de linfocitos T.

ES 2 398 760 T3

También se ha indicado que esta citocina desempeña un papel en la regulación de la activación de linfocitos B, función citotóxica de linfocitos citolíticos naturales y síntesis de inmunoglobulina.

Nota de publicación: Este registro de RefSeq incluye un subconjunto de las publicaciones que están disponibles para este gen. Por favor, véase el registro de Entrez Gene para acceder a publicaciones adicionales.

```

ELEMENTOS      Localización/Calificadores
  source      1..193
                /orgahism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxón:9606"
                /chromosome="19"
                /map="19p13"
  Protein     1..193
                /product="superfamilia de ligando de factor de necrosis
                tumoral, miembro 7"
                /note="antígeno CD70; ligando de CD27; antígeno de superficie
                CD70; antígeno Ki-24; superfamilia de factor de necrosis
                tumoral (ligando), miembro 7"
                /calculated_mol_wt=2 0987
  Region     58..189
                /region_name="TNF"
                /note="Factor de Necrosis Tumoral; los miembros de la
                superfamilia de TNF incluyen las citocinas: TNF (TNF-alfa), LT
                (linfotóxina-alfa, TNF-beta), ligando CD40, Apo2L (TRAIL),
                ligando de Fas y ligando de osteoprotegerina (OPG); cd00184"
                /db_xref="CDD:29146"
  Site       order(61,105,107,154,159,185,189)
                /site_type="otro"
                /note="interfaz de trímero"
                /db_xref="CDD:29146"
  Site       order(76..77,84,119,126,129)
                /site_type="otro"
                /note="sitios de unión a receptor"
                /db_xref="CDD:29146"
  CDS        1..193
                /gene="CD70"
                /coded_by="NM_001252.3:151..732"
                /db_xref="CCDS:CCDS12170.1"
                /db_xref="GenelD:970"
                /db_xref="HGNC:11937"
                /db_xref="HPRD:18515"
                /db_xref="MIM:602840"

```


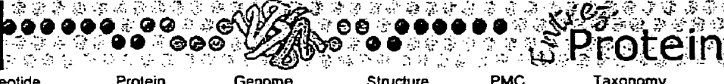
ORIGEN

```

  1 mpeegsgcsvg rrrpygcvlr aalvplvagl viclvvcigr faqaqqqlpl eslgwdvael
  61 qlnhtgpqgd prlywgggpa lgrsflhgpe ldkgqlrihr dgiymvhiqv tlaicsstta
  121 srhhpttlav gicsparsrsi sllrlsfhgg ctiasqrllp largdtlctn ltgtllpsrn
  181 tdetffgvqw vrp

```

//



My NT [\[Sign In\]](#) [\[Regis\]](#)

[PubMed](#) [Nucleotide](#) [Protein](#) [Genome](#) [Structure](#) [PMC](#) [Taxonomy](#) [OMIM](#) [Books](#)

Search for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display [GenPept](#) Show

Range: from to Features: SNP CDD

1: NP_742011. Reports tumor necrosis fa...[gi:25952147]

[BLink](#), [Conserved Domains](#), [Links](#)

[Comment](#) [Features](#) [Sequence](#)

LOCUS NP_742011 204 aa lineal PRI 16-MAR-2008
 DEFINICIÓN Superfamilia de ligando de factor de necrosis tumoral, miembro 14 isoforma 2 [Homo sapiens].
 REFERENCIA NP_742011
 VERSIÓN NP_742011.1 GI:25952147
 FUENTE DB REFSEQ: referencia [NM_172014.1](#)
 PALABRAS CLAVE
 FUENTE Homo sapiens (ser humano)
 ORGANISMO [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCIA 1 (restos 1 a 204)
 AUTORES Pawlak,K., Pawlak,D. y Mysliwiec,M.
 TÍTULO LIGHT—a new member of the TNF superfamily in the plasma, dialysate and urine of uremic patients; the impact of residual diuresis and presence of viral hepatitis
 PUBLICACIÓN Clin. Biochem. 40 (16-17), 1240-1244 (2007)
 PUBMED 17826757
 OBSERVACIÓN GeneRIF: Los niveles de LIGHT en plasma parecen ser similares en pacientes con hemodiálisis (HD) y sujetos sanos y no se vieron afectados por el sexo, edad, el periodo medio de historial de HD, etiología de la enfermedad, tipo de medicación y tipo de membrana de diálisis en uso.

REFERENCIA 2 (restos 1 a 204)
 AUTORES Celik.S., Langer,H., Stellos,K., May.A.E., Shankar,V., Kurz,K., Katus.H.A., Gawaz,M.P. y Dengler.T.J.
 TÍTULO Platelet-associated LIGHT (TNFSF14) mediates adhesion of platelets to human vascular endothelium
 PUBLICACIÓN Thromb. Haemost. 98 (4), 798-805 (2007)
 PUBMED 17938804
 OBSERVACIÓN GeneRIF: LIGHT asociado a plaquetas está implicado en la adhesión de plaquetas a endotelio mientras que LIGHT soluble induce un estado proinflamatorio en células endoteliales vasculares

REFERENCIA 3 (restos 1 a 204)
 AUTORES Loeffler,M., Le'Negrate.G., Krajewska,M. y Reed,J.C.
 TÍTULO Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth
 PUBLICACIÓN Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104 (31), 12879-12883 (2007)
 PUBMED [17652173](#)

ES 2 398 760 T3

OBSERVACIÓN GeneRIF: la Salmonella typhimurium atenuada que expresaba LIGHT inhibió el crecimiento de tumores primarios, así como la diseminación de metástasis pulmonares, en diversos modelos tumorales de ratón empleando líneas celulares de carcinoma murino en ratones inmunocompetentes

REFERENCIA 4 (restos 1 a 204)

AUTORES Nadiminty,N., Chun,J.Y., Hu,Y., Dutt,S., Lin.X. y Gao,A.C.

TÍTULO LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway

PUBLICACIÓN Biochem. Biophys. Res. Commun. 359 (2), 379-384 (2007)

PUBMED 17543278

OBSERVACIÓN GeneRIF: además de activar NF-kappaB/p52, LIGHT también activa Stat3 a través de la ruta de NIK

REFERENCIA 5 (restos 1 a 204)

AUTORES Gill,R.M., Coleman,N.M. y Hunt,J.S.

TÍTULO Differential cellular expression of LIGHT and its receptors in early gestation human placentas

PUBLICACIÓN J. Reprod. Immunol. 74 (1-2), 1-6 (2007)

PUBMED 17010447

OBSERVACIÓN GeneRIF: el sistema LIGHT puede regular los estadios temprano a medio de desarrollo placentario mediante expresión programada temporalmente específica de células del ligando y sus receptores, y también puede ayudar a conservar el privilegio inmune placentario.

REFERENCIA 6 (restos 1 a 204)

AUTORES Yu.K.Y., Kwon.B., Ni,J., Zhai,Y., Ebner.R. y Kwon.B.S.

TÍTULO A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis

PUBLICACIÓN J. Biol. Chem. 274 (20), 13733-13736 (1999)

PUBMED 10318773

REFERENCIA 7 (restos 1 a 204)

AUTORES Harrop,J.A., McDonnell,P.C., Brigham-Burke,M., Lyn,S.D., Minton,J., Tan, K.B., Dede,K., Spanpanato,J., Silverman,C., Hensley.P., DiPrinzio,R., Emery, J.G., Deen,K., Eichman.C, Chabot-Fletcher.M., Truneh,A. y Young,P.R.

TÍTULO Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth

PUBLICACIÓN J. Biol. Chem. 273 (42), 27548-27556 (1998)

PUBMED 9765287

REFERENCIA 8 (restos 1 a 204)

AUTORES Zhai,Y., Guo,R., Hsu,T.L., Yu,G.L., Ni,J., Kwon,B.S., Jiang,G.W., Lu,J., Tan, J., Ugustus,M., Carter, K. , Rojas,L., Zhu,F., Lincoln,C, Endress,G., Xing,L., Wang,S., Oh,K.O., Gentz,R., Ruben,S., Lippman,M.E., Hsieh,S.L. y Yang,D.

TÍTULO LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer

PUBLICACIÓN J. Clin. Invest. 102 (6), 1142-1151 (1998)

PUBMED 9739048

REFERENCIA 9 (restos 1 a 204)

AUTORES Marsters, S.A., Sheridan,J.P., Pitti,R.M., Brush,J., Goddard.A. y Ashkenazi,A.

TÍTULO Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3

PUBLICACIÓN Curr. Biol. 8 (9), 525-528 (1998)

PUBMED 9560343

REFERENCIA 10 (restos 1 a 204)

AUTORES Mauri,D.N., Ebner.R., Montgomery,R.I., Kochel,K.D., Cheung,T.C., Yu.G.L., Ruben,S., Murphy,M., Eisenberg,R.J., Cohen,G.H., Spear,P.G. y Ware,C.F.

TÍTULO LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator

PUBLICACIÓN Immunity 8 (1), 21-30 (1998)

PUBMED 9462508

ES 2 398 760 T3

COMENTARIO REFSEQ REVISADO: Este registro se ha revisado por el personal de NCBI. La secuencia de referencia derivó de [AY028261.1](#) y [AF064090.1](#).

Sumario: La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de ligando de factor de necrosis tumoral (TNF). Esta proteína es un ligando para TNFRSF14, que es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, y que también se conoce como un mediador de entrada de herpesvirus (HVEM). Esta proteína puede actuar como un factor coestimulador para la activación de células linfoides y como un elemento disuasorio de infección por herpesvirus. Se ha demostrado que esta proteína estimula proliferación de linfocitos T, y desencadena apoptosis de diversas células tumorales. También se ha indicado que esta proteína evita la apoptosis mediada por factor de necrosis tumoral alfa en hepatocito primario. Se han presentado dos variantes de transcrito de corte y empalme alternativo que codifican isoformas distintas.

Variante de transcrito: Esta variante (2) carece de un segmento de codificación en fase en comparación con la variante 1, dando como resultado una isoforma (2) que carece de una región interna, en comparación con la isoforma 1.

Nota de Publicación: Este registro de RefSeq incluye un subconjunto de las publicaciones que están disponibles para este gen. Por favor, véase el registro de Entrez Gene para acceder a publicaciones adicionales.

ELEMENTOS

source
1..204
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxón:9606"
/chromosome="19"
/map="19p13.3"

Protein
1..204
/product="superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral, miembro 14 isoforma 2"
/note="LIGHT transmembrana delta; miembro de superfamilia de factor de necrosis tumoral LIGHT; mediador de entrada de herpesvirus A; tipo receptor de factor de necrosis tumoral 2; ligando para mediador de entrada de herpesvirus"
/calculated_mol_wt=22265

Region
58..202
/region_name="TNF"
/note="Factor de necrosis tumoral; los miembros de la superfamilia de TNF incluyen las citocinas: TNF (TNF-alfa), LT (linfotóxina-alfa, TNF-beta), ligando de CD40, Apo2L (TRAIL), ligando de Fas y ligando de osteoprotegerina (OPG); cd00184"
/db_xref="CDD:29146"

Site
order(61,106,108,166,171,198,202)
/site_type="otro"
/note="interfaz de trímero"
/db_xref="CDD:29146"


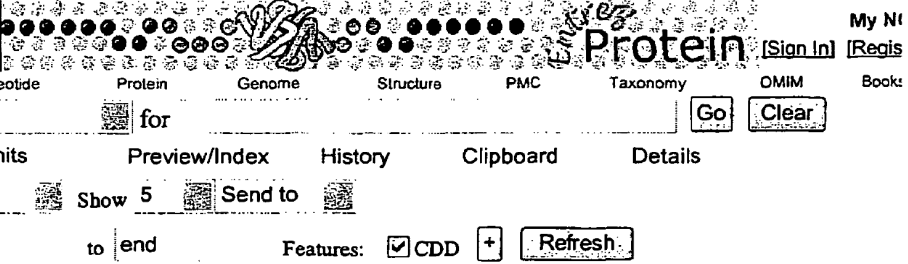
Site
order(79..80,85,127,134,139)
/site_type="otro"
/note="sitios de unión a receptor"
/db_xref="CDD:29146"

CDS
1..204
/gene="TNFRSF14"
/coded_by="NM_172014.1:383..997"
/note="la isoforma 2 se codifica por la variante de transcrito 2"
/db_xref="GeneID:8740"
/db_xref="HGNC:1193_0"
/db_xref="MIM:604520"

ORIGEN

1 meesvvrpsv fvvdgqtdip ftrlgrshrr qscsvardgp agsweqliqe rrshevpaa
61 hltganssit gsggp1lwet qlglaf1rg1 syhdgalvvt kagyyyiysk vqlggvgcpl
121 glastithgl ykrtprypee lellvsqqsp cgratsssrw wwdssflggv vhleageevv
181 vrvlderlvr lrdgtrsyfg afmv

//

[PubMed](#) [Nucleotide](#) [Protein](#) [Genome](#) [Structure](#) [PMC](#) [Taxonomy](#) [OMIM](#) [Book](#)

Search for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display [GenPept](#)

Range: from to Features: CDD

1: [AAB97877](#). Reports CD30L protein [Ho...[gi:2815515]



[BLink](#), [Conserved Domains](#), [Links](#)

Features	Sequence
LOCUS	AAB97877 234 aa lineal PRI 28-ENE-1998
DEFINICIÓN	Proteína CD30L [Homo sapiens].
REFERENCIA	AAB97877
VERSIÓN	AAB97877.1 GI:2815515
FUENTE DB	locus HSCD30L1 referencia AF006381.1 locus HSCD30L2 referencia AF006382.1 locus HSCD30L3 referencia AF006383.1 locus HSCD30L4 referencia AF006384.1
PALABRAS CLAVE	.
FUENTE	Homo sapiens (ser humano)
ORGANISMO	Homo sapiens Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini, Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCIA	1 (restos 1 a 234)
AUTORES	Croager.E.J. y Abraham,L.J.
TÍTULO	Characterisation of the human CD30 ligand gene structure
PUBLICACIÓN	Biochim. Biophys. Acta 1353 (3), 231-235 (1997)
PUBMED	9349718
REFERENCIA	2 (restos 1 a 234)
AUTORES	Croager.E.J. y Abraham,L.J.
TÍTULO	Presentación Directa
PUBLICACIÓN	Presentado (02-JUN-1997) Biochemistry, University of Western Australia, Entrance 2, Hackett Drive, Nedlands, Western Australia 6907, Australia
COMENTARIO	Procedimiento: traducción conceptual.
ELEMENTOS	Localización/Calificadores
source	1. .234 /organism="Homo sapiens" /db_xref="taxón:9606" /chromosome="9" /map="9q33"
Protein	1 234 /product="proteína CD30L"
Region	104..220 /region_name="TNF" /note="Factor de Necrosis tumoral; los miembros de la superfamilia de TNF incluyen las citocinas: TNF (TNF-alfa), LT (linfotoxina-alfa, TNF-beta), ligando de CD40, Apo2L (TRAIL), ligando de Fas y ligando de osteoprotegerina (OPG); cd00184" /db_xref="CDD:29146"
Site	order(107,140,142,190,195)

```

/site_type="otro"
/note="interfaz de trómero"
/db_xref=-CDD:29146"
Site order(116..117,157,164,169)
/site_type="otro"
/note="sitio de unión a receptor"
/db_xref="CDD:29146"
CDS 1..234
/gene="CD30L"
/coded_by="join(AF006381.1:1599..1793,AF006382.1:188..230,
AF006383.1:534..605,AF006384.1:347..741)"
ORIGIN
1 mdpqlqgaln gmappgdtam hvpagsvash lgttsrsyfy lttatlalcl vftvatimvl
61 vvqrtdsipn spdnvplkgg ncsedllcil krapfkkswa ylqvakhlnk tklswnkdgi
121 lhgvrygdgn lviqfpglyf iicqlqflvq cpnnsvdlkx ellinkhikk qxlvtvcesg
181 mqtkhvyqnl sqflldylqv nttisvrvdt xqyidtstfp lenvlisiflx snsd
//

```



My NCBI [Sign In](#) [Register](#)

[PubMed](#) [Nucleotide](#) [Protein](#) [Genome](#) [Structure](#) [PMC](#) [Taxonomy](#) [OMIM](#) [Books](#)

Search for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display [GenPept](#)

Range: from to Features: CDD

1: [P42081](#). Reports T-lymphocyte acti...[gi:1168851]

[BLink](#), [Conserved Domains](#), [Links](#)

Comment	Features	Sequence
LOCUS	P42081	329 aa lineal PRI 15-ENE-2008
DEFINICIÓN	Precursor de antígeno de activación de linfocitos T CD86 (antígeno B7.2 de activación) (contrarreceptor de CTLA-4 B7.2) (B70) (FUN-1) (BU63).	
REFERENCIA	P42081	
VERSIÓN	P42081.1 GI:1168851	
FUENTE DB	swissprot: locus CD86_HUMAN, referencia P42081 ; clase: convencional. referencias extra:AONOPO,Q13655,Q6FHB1,Q6GTS4,Q7M4L5 creado: 1 de noviembre de 1995. secuencia actualizada: 1 de noviembre de 1995. anotación actualizada: 15 de enero de 2008. xrefs: U04343.1 , AAB03814.1 , L25259.1 , AAA58389.1 , CR541844.1 , CAG46642.1 , EF064748.1 , ABK41931.1 , BC040261.1 , AAH40261.1 , U17722.1 , AAA86473.1 , U17717.1 , U17718.1 , U17719.1 , U17721.1 , A48754 , JC7605 , 1I85, 1NCN xrefs (base de datos no de secuencia): UniGener: Hs.171182 , PDBsum:1I85, PDBsum:1NCN, IntAct:P42081, Ensembl:ENSG00000114013, KEGG:hsa:942, H-InvDB: HIX0024331 , HGNC:1705, HPA:CAB004319, MIM:601020, PharmGKB:PA26243, LinkHub:P42081, ArrayExpress:P42081, CleanEx:HS_CD86, GermOnline:ENSG00000114013, GO:0016021, GO:0005886, GO:0015026, GO:0005515, GO:0016563, GO:0007267, GO:0008284, GO:0045086, GO:0045404, GO:0043017, GO:0045630, GO:0045941, InterPro: IPR015651 , InterPro: IPR007110 , InterPro: IPR013783 , InterPro: IPR003006 , InterPro: IPR013106 , InterPro: IPR003596 , Gene3D:G3DSA:2.60.40.10, PANTHER:PTHR13712:SF45, Pfam: PF07686 , SMART:SM00406, PROSITE:PS50835, PROSITE:PS00290	
PALABRAS CLAVE	Estructura en 3D; corte y empalme alternativo; glicoproteína; interacción huésped-virus; dominio de inmunoglobulina; membrana; polimorfismo; receptor; señal; transmembrana; conjugación de Ubl.	
FUENTE	Homo sapiens (ser humano)	
ORGANISMO	Homo sapiens Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.	
REFERENCIA	1 (restos 1 a 329)	
AUTORES	Azuma,M., Ito,D., Yagita,H., Okumura,K., Phillips, J.H., Lanier,L.L. y Somoza,C.	
TÍTULO	B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28	
PUBLICACIÓN	Nature 366 (6450), 76-79 (1993)	
PUBMED	7694153	
OBSERVACIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNM] (ISOFORMA 2).	

ES 2 398 760 T3

REFERENCIA 2 (restos 1 a 329)
 AUTORES Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Ng, J.W., Restivo, V.A. Jr., Lombard, L.A., Gray, G.S. y Nadler, L.M.

TÍTULO Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation

PUBLICACIÓN Science 262 (5135), 909-911 (1993)
 PUBMED [7694363](#)

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNM] (ISOFORMA 1).
 REFERENCIA 3 (restos 1 a 329)
 AUTORES Magistrelli, G., Caron, G., Gauchat, J.F., Jeannin, P., Bonnefoy, J.Y. y Delneste, Y.

TÍTULO Identification of an alternatively spliced variant of human CD86 mRNA

PUBLICACIÓN Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (5), 1211-1215 (2001)
 PUBMED [11162656](#)

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNM] (ISOFORMA 3).
 REFERENCIA 4 (restos 1 a 329)
 AUTORES Halleck, A., Ebert, L., Mkoundinya, M., Schick, M., Eisenstein, S., Neubert, P., Kstrang, K., Schatten, R., Shen, B., Henze, S., Mar, W., Korn, B., Zuo, D., Hu, Y. y LaBaer, J.

TÍTULO Presentación directa
 PUBLICACIÓN Presentado (??-JUN-2004)
 OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNM A GRAN ESCALA] (ISOFORMA 2).
 REFERENCIA 5 (restos 1 a 329)
 AUTORES Livingston, R.J., Shaffer, T., McFarland, I., Nguyen, C.P., Stanaway, I.B., Rajkumar, N., Johnson, E.J., da Ponte, S-H., Willa, H., Ahearn, M.O., Bertucci, C., Acklestad, J., Carroll, A., Swanson, J., Gildersleeve, H.I. y Nickerson, D.A.

TÍTULO Presentación directa
 PUBLICACIÓN Presentado (??-OCT-2006)
 OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ADN GENÓMICO].
 REFERENCIA 6 (restos 1 a 329)
 AUTORES Gerhard, D.S., Wagner, L., Feingold, E.A., Shenmen, C.M., Grouse, L.H., Schuler, G., Klein, S.L., Old, S., Rasooly, R., Good, P., Guyer, M., Peck, A.M., Derge, J.G., Lipman, D., Collins, F.S., Jang, W., Sherry, S., Feolo, M., Misquitta, L., Lee, E., Rotmistrovsky, K., Greenhut, S.F., Schaefer, C.F., Buetow, K., Bonner, T.I., Haussler, D., Kent, J., Kiekhaus, M., Furey, T., Brent, M., Prange, C., Schreiber, K., Shapiro, N., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Hsie, F., Driscoll, T., Soares, M.B., Casavant, T.L., Scheetz, T.E., Brownstein, M.J., Usdin, T.B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Piao, Y., Dudekula, D.B., Ko, M.S., Kawakami, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Gruber, C-E., Smith, M.R., Simmons, B., Moore, T., Waterman, R., Johnson, S.L., Ruan, Y., Wei, C.L., Mathavan, S., Gunaratne, P.H., Wu, J., Garcia, A.M., Hulyk, S.W., Fuh, E., Yuan, Y., Sneed, A., Kowis, C., Hodgson, A., Muzny, D.M., McPherson, J., Gibbs, R.A., Fahey, J., Helton, E., Ketteman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madari, A., Young, A.C., Wetherby, K. D., Granite, S.J., Kwong, P.N., Brinkley, C.P., Pearson, R.L., Bouffard, G.G., Blakesly, R.W., Green, E.D., Dickson, M.C., Rodriguez, A.C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R.M., Butterfield, Y.S., Griffith, M., Griffith, O.L., Krzywinski, M.I., Liao, N., Morin, R., Palmquist, D., Petrescu, A.S., Skalska, U., Smailus, D.E., Stott, J.M., Schnerch, A., Schein, J.E., Jones, S.J., Holt, R.A., Baross, A., Marra, M.A., Clifton, S., Makowski, K.A., Bosak, S. y Malek, J.

CONSRM MGC Project Team
 TÍTULO The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC)
 PUBLICACIÓN Genome Res. 14 (10B), 2121-2127 (2004)
 PUBMED [15489334](#)

ES 2 398 760 T3

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ARNM A GRAN ESCALA] (ISOFORMA 1) Y VARIANTE THR-310.
TEJIDO=Cerebro
Errata: [Genome Res. Jun 2006; 16(6):804. Morrin, Ryan [corregido a Morin, Ryan]]

REFERENCIA 7 (restos 1 a 329)
AUTORES Jellis,C.L., Wang.S.S., Rennert,P., Borriello,F., Sharpe,A.H., Green,N.R. y Gray,G.S.

TÍTULO Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86)

PUBLICACIÓN Immunogenetics 42 (2), 85-89 (1995)
PUBMED [7541777](#)

OBSERVACIÓN SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS [ADN GENÓMICO] DE 7-329.
TEJIDO=Prepucio

REFERENCIA 8 (restos 1 a 329)
AUTORES Lanier,L.L., O'Fallon,S., Somoza,C, Phillips,J.H., Linsley, P.S. , Okumura,K., Ito,D. y Azuma,M.

TÍTULO CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL

PUBLICACIÓN J. Immunol. 154 (1), 97-105 (1995)
PUBMED [7527824](#)

OBSERVACIÓN CARACTERIZACIÓN

REFERENCIA 9 (restos 1 a 329)
AUTORES Engel,P., Gribben,J.G., Freeman,G.J., Zhou,L.J., Nozawa.Y., Abe,M., Nadler.L.M., Wakasa,H. y Tedder.T.F.

TÍTULO The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen

PUBLICACIÓN Blood 84 (5), 1402-1407 (1994)
PUBMED [7520767](#)

OBSERVACIÓN IDENTIFICACIÓN COMO CD86.

REFERENCIA 10 (restos 1 a 329)
AUTORES Goto.E., Ishido,S., Sato.Y., Ohgimoto,S., Ohgimoto.K., Nagano-Fujii,M. y Hotta.H.

TÍTULO c-MIR, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins MIR1 and MIR2 and has similar activity

PUBLICACIÓN J. Biol. Chem. 278 (17), 14657-14668 (2003)
PUBMED [12582153](#)

OBSERVACIÓN UBIQUITINACIÓN E INTERACCIÓN CON MARCH8.

COMENTARIO En o antes de 27 de febrero de 2007 esta versión de secuencia remplazó gi:74721835, gi:74757610, gi:627415, gi:25392201.
[FUNCIÓN] Receptor implicado en la señal coestimuladora esencial para proliferación de linfocitos T y producción de interleucina 2, mediante unión de CD28 o CTLA-4. Puede desempeñar un papel crítico en los acontecimientos tempranos de la activación de linfocitos T y coestimulación de linfocitos T vírgenes, tales como decidir entre inmunidad y anergia que se realiza por linfocitos T en un periodo de 24 horas después de la activación. La isoforma 2 interfiere con la formación de grupos de CD86 y actúa de este modo como un regulador negativo de la activación de linfocitos T.
[SUBUNIDAD] Interacciona con MARCH8. Interacciona con la proteína MIR2 de herpesvirus humano 8 (Probable).
[LOCALIZACIÓN SUBCELULAR] Membrana; proteína de membrana de tipo I de paso único.
[PRODUCTOS ALTERNATIVOS] Acontecimiento=corte y empalme alternativo; isoformas nombradas=3; nombre=1; IsoId=P42081-1; secuencia=presentada; nombre=2; IsoId=P42081-3; secuencia=VSP_023124; nombre=3; sinónimos=CD86 deltaEC; IsoId=P42081-2; secuencia=VSP_009125.
[ESPECIFICIDAD TISULAR] Expresado por linfocitos B activados y monocitos.
[PTM] Poliubiquitinizado; que se promueve por MARCH8 y da como resultado endocitosis y degradación lisosomal.

ES 2 398 760 T3

[SIMILITUD] Contiene un dominio de tipo C2 similar a Ig (de tipo inmunoglobulina)
 [SIMILITUD] Contiene un dominio de tipo V similar a Ig (de tipo inmunoglobulina)
 [RECURSO WEB] Nombre=Wikipedia; Nota=entrada CD86;
 URL='http://en.wikipedia.org/wiki/CD86'.

ELEMENTOS	Localización/Calificadores
<u>source</u>	1..329 /organism="Homo sapiens" /db_xref="taxón:9606"
<u>gene</u>	1..329 /gene="CD86" /note="sinónimo: CD28LG2"
<u>Protein</u>	1. .329 /gene="CD86" /product="precursor de antígeno de activación de linfocitos T CD86 "
<u>Region</u>	1..23 /gene="CD86" /region_name="Señal" /inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales" /note="Potencial."
<u>Region</u>	1..6 /gene="CD86" /region_name="Variante de corte y empalme" /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales" /note="Ausente (en isoforma 2). /FTId=VSP_023124."
<u>Region</u>	22..234 /gene="CD86" /region_name="Variante de corte y empalme" /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales" /note="Ausente (en isoforma 3). /FTId=VSP_009125."
<u>Region</u>	24..329 /gene="CD86" /region_name="Cadena madura" /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales " /note="Antígeno de activación de linfocitos T CD86". /FTId=PRO_0000014550."
<u>Region</u>	24..247 /gene="CD86" /region_name="Dominio topológico" /inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales" /note="Extracelular (Potencial)."
<u>Region</u>	27. .31 /gene="CD86" /region_name="Región de cadena beta" /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
<u>Region</u>	27 /gene="CD86" /region_name="Conflicto" /experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales" /note="K -> E (en Ref. 7; AAA86473)."
<u>Region</u>	33..131 /gene="CD86"

ES 2 398 760 T3

```

/region_name="Dominio"
/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles
adicionales"
/note="Tipo V similar a Ig"
Site 33
/gene="CD86"
/site_type="glicosilación"
/inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles
adicionales"
/note="Ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."
```

Region 35..110

```

/gene="CD86"
/region_name="IGv"
/note="inmunoglobulina de tipo V; smart00406"
/db_xref="CDD:47715"
```

Region 36..38

```

/gene="CD86"
/region_name="Región de cadena beta"
/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles
adicionales"
```

Bond bond(40,110)

```

/gene="CD86"
/bond_type="disulfuro"
/inference="pruebas experimentales, no se registraron detalles
adicionales"
/note="Potencial."
```

Site 47

```

/gene="CD86"
/site_type="glicosilación"
/inference="pruebas experimentales, no se registraron detalles
adicionales"
/note="ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."
```

Region 54..58

```

/gene="CD86"
/region_name="región de cadena beta"
/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles
adicionales"
```

Region 64..69

```

/gene="CD86"
/region_name="Región de cadena beta"
/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles
adicionales"
```

Region 80..84

```

/gene="CD86"
/region_name="Vuelta con enlace de hidrógeno"
/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles
adicionales"
```

Region 85..88

```

/genescD86"
/region_name="Región de cadena beta"
/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles
adicionales"
```

Region 90..92

```

/genescD86"
/region_name="Vuelta con enlace de hidrógeno"
/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles
adicionales"
```

Region 95..97

```

/gene="CD86"
/region_name="Región de cadena beta"
```

ES 2 398 760 T3

/experiment= "pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
Region 106..113
/gene="CD86"
/region_name="Región de cadena beta"
/experiment=pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales
Region 122. .133
/gene="CD86"
/region_name="Región de cadena beta"
/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
Site 135
/gene="CD86"
/site_type="glicosilación"
/inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"
/note="Ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."
Site 146
/gene="CD86"
/site_type="glicosilación"
/inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"
/note="Ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."
Region 150..225
/gene="CD86"
/region_name="Dominio"
/experiment=pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
/note="Tipo C2 similar a Ig."
Site 154
/gene="CD86"
/site_type="glicosilación"
/inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"
/note="Ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."
Bond bond(157,218)
/gene="CD86"
/bond_type="disulfuro"
/inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"
/note="Potencial."
Region 170
/gene="CD86"
/region_name="Variante"
/experiment="pruebas experimentales, no se registraron detalles adicionales"
/note="S -> N (en dbSNP:rs9282642) . /FTId=VAR_021916. "
Site 177
/genes="D86"
/site_type="glicosilación"
/inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"
/note="Ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."
Site 192
/gene="CD86"
/site_type="glicosilación"
/inference="pruebas no experimentales, no se registraron detalles adicionales"
/note="Ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."

ES 2 398 760 T3

```

Site      213
          /gene="CD86"
          /site_type="glicosilación"
          /inference="pruebas no experimentales, no se registraron
          detalles adicionales"
          /note="Ligado a N (GlcNAc...) (Potencial)."
```

```

Region    248..268
          /gene="CD86"
          /region_name="Región transmembrana"
          /inference="pruebas no experimentales, no se registraron
          detalles adicionales"
          /note="Potencial."
```

```

Region    269..329
          /gene="CD86"
          /region_name="Dominio topológico"
          /inference="pruebas no experimentales, no se registraron
          detalles adicionales"
          /note="Citoplásmico (Potential)."
```

```

Region    310
          /gene="CD86"
          /region_name="Variante"
          /experiment="pruebas experimentales, no se registraron
          detalles adicionales"
          /note="A -> T (en dbSNP:rs1129055). /FTId=VAR_014650."
```

```

Region    323
          /gene="CD86"
          /region_name="Variante"
          /experiment="pruebas experimentales, no se registraron
          detalles adicionales"
          /note="D -> N (en dbSNP:rs9282648). /FTId=VAR_021917."
```

ORIGEN -----

```

. 1 mdpqctmgls nilfvmafll sgaaplkiqa yfnetadlpc qfansqngsl selvvfwqdq
 61 enlvlnevyl gkekfdsvhs kymgrtsfds dswtlrlhnl qikdkglyqc iihhkkptgm
121 irihqmnsel svlanfsqpe ivpnsiten vyinltcssi hgypepkms vllrtknsti
181 eydgimqksq dnvteydvvs islsvsfpdv tsnmtifcil etdktrllss pfsieledpq
241 pppdhipwit avlptviicv mvfclilkw kkkkrprnsy kcgntmtere eseqtkkrek
301 ihipersdea qrvfksskts scdksdtcf
```

//