

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 891**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2007 E 07754126 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2002263**

54 Título: **Composiciones de inmunoterapia contra el cáncer y métodos de uso**

30 Prioridad:

**31.03.2006 US 788296 P**

**28.03.2007 US 729339**

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

**15.07.2014**

73 Titular/es:

**ADURO GVAX INC. (50.0%)  
626 Bancroft Way, No. 3C  
Berkeley, CA 94710-2224, US y  
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
CALIFORNIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SIMMONS, ANDREW;  
JOOSS, KARIN y  
ALLISON, JAMES**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 476 891 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

Composiciones de inmunoterapia contra el cáncer y métodos de uso

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones celulares y a métodos para inducir una respuesta inmune frente a células tumorales. Las composiciones celulares comprenden células que se han modificado genéticamente para expresar un anticuerpo contra el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) y una citocina, por lo que la expresión local, sostenida basada en células, del anticuerpo anti-CTLA4 en el sitio de la inmunización reduce significativamente la concentración terapéutica en comparación con una administración sistémica.

**Antecedentes de la Tecnología**

10 Una metodología terapéutica contra el cáncer es el uso de células cancerígenas autólogas o alogénicas como vacunas para aumentar la inmunidad antitumoral (Oettgen *et al.*, The History of Cancer Immunotherapy, en: Biologic Therapy of Cancer, Devita *et al.*, (compiladores) J. Lippincot Co., págs. 87-199, 1991; Armstrong TD y Jaffee EM, Surg Oncol Clin N Am 11(3): 681-96, 2002 y Bodey B *et al.*, Anticancer Res. 20(4): 2665-76, 2000). Una expansión de esta metodología implica el uso de células tumorales modificadas genéticamente que expresan citocinas, a nivel local en el sitio de la inmunoterapia.

Se ha observado que numerosas citocinas desempeñan un papel en la regulación de la respuesta inmune a tumores. Por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. nº 5.098.702 describe el uso de combinaciones de factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 2 (IL-2) e interferón beta (IFN-beta) en cantidades sinérgicamente eficaces para combatir tumores existentes. Los documentos de patente de EE.UU. nº 5.078.996, 5.637.483, 5.904.920 y 6.350.445 describen el uso del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) para el tratamiento de tumores. Se ha demostrado la actividad en modelos tumorales usando una variedad de citocinas inmunomoduladoras, que incluyen la interleucina 4 (IL-4), IL-2, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), la interleucina 7 (IL-7), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 12 (IL-12) y GM-CSF, tal y como se describe en Golumbeck PT *et al.*, Science 254: 13-716, 1991; Gansbacher B *et al.*, J. Exp. Med. 172: 1217-1224, 1990; y Akiyama Y *et al.*, Gene Therapy 7: 2113-2121, 2000; Fearon ER *et al.*, Cell 60: 397-403, 1990; Gansbacher B *et al.*, Cancer Res. 50: 7820-25, 1990; Teng M *et al.*, PNAS 88: 3535-3539, 1991; Columbo MP *et al.*, J. Exp. Med. 174:1291-1298, 1991; Aoki *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 89(9): 3850-4, 1992; Porgador A, *et al.*, Nat. Immun. 13(2-3): 113-30, 1994; Dranoff G *et al.*, PNAS 90: 3539-3543, 1993; Lee CT *et al.*, Human Gene Therapy 8:187-193, 1997; Nagai E *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 47:2-80, 1998; Akiyama Y *et al.*, Gene Therapy 7: 2113-2121, 2000; y Chang A *et al.*, Human Gene Therapy 11: 839-850, 2000, respectivamente. Los ensayos clínicos que emplean vacunas celulares autólogas o alogénicas que expresan GM-CSF (GVAX<sup>®</sup>) han comenzado el tratamiento del cáncer de próstata, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer renal y mieloma múltiple (Dummer R., Curr Opin Investig Drugs 2(6): 844-8, 2001; Simons J *et al.*, Cancer Res. 15: 59(20): 5160-8, 1999; Soiffer R. *et al.*, PNAS 95: 13141-13146, 1998; Simons J *et al.*, Cancer Res. 15: 57: 1537-1546, 1997; Jaffee E *et al.*, J. Clin Oncol 19:145-156, 2001; y Salgia R *et al.*, J. Clin Oncol 21: 624 -630, 2003; Soiffer *et al.* J Clin Oncol 2003 21: 3343B50; Nemunaitis *et al.* J. Natl Cancer Inst. 18 de Febrero 2004 96(4): 326-31).

Las inmunoterapias celulares autólogas o alogénicas contra el cáncer que expresan GM-CSF se han descrito anteriormente (por ejemplo, véanse los documentos de patente de Estados Unidos 6.464.973, 6.350.445, 6.187.306, 6.033.674, 5.985.290 y 5.637.483). Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de mejorar las estrategias de inmunoterapias basadas en GVAX<sup>®</sup> para el tratamiento del cáncer.

Se han descrito previamente células dendríticas modificadas genéticamente para la inmunoterapia del cáncer. Véase, p. ej., Akiyama Y *et al.*, Gene Therapy 7: 2113-2121, 2000 y Ribas A, Current Gene Therapy 5: 619-628, 2005.

45 El antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4; CTLA-4; CD152) es una molécula inmunosupresora expresa en linfocitos T activados y un subconjunto de linfocitos T CD4+CD25+. CTLA4 es un regulador conocido de la activación de linfocitos T (Chambers, C. A. *et al.*, Annu. Rev. Immunol 19: 565, 2001). La señalización de CTLA4 ha mostrado que inhibe los primeros eventos en la activación de los linfocitos T tanto a nivel de transcripción de IL-2 como a nivel de eventos del ciclo celular independientes de IL-2 (Brunner *et al.*, J. Immunol., 1999, 162: 5813-5820).

50 CTLA4, que se une a B7-1/2 es esencial para la regulación a la baja de las respuestas de los linfocitos T. Se ha observado que ratones CTLA4<sup>-/-</sup> sufren una respuesta linfoproliferativa letal que se inicia por una expansión incontrolada de los linfocitos T. Por lo tanto, CD28 y CTLA4 desempeñan papeles decisivos en la regulación de las primeras etapas de la respuesta de los linfocitos T. CTLA4 también se ha observado que regula la aparición y la gravedad de una enfermedad autoinmune experimental en ratones (Allison, J. P., Cancer Immunity, vol. 5 supl. 1, pág. 9; 6 de abril 2005).

55 Un anticuerpo monoclonal totalmente humano para CTLA4 humano ha mostrado actividad antitumoral en ensayos en fase I/II y II (Medarex). Un estudio en fase I de un anticuerpo humano anti-CTLA4 en pacientes con melanoma metastásico y carcinoma de ovario, vacunados previamente, mostraba actividad antitumoral en cinco de los nueve

pacientes estudiados (Hodi FS *et al.*, PNAS 100:4712-4717, 2003). En un estudio distinto en fase I que implicaba la administración de un anticuerpo monoclonal totalmente humano que bloqueaba CTLA4 (MDX-010), combinado con vacunas peptídicas contra el melanoma, ocho de diecinueve pacientes con resección de melanoma metastásico en estadio III o IV que recibieron dosis repetidas de MDX-010, desarrollaron toxicidades autoinmunes significativas. Los síntomas incluían uveítis, erupciones cutáneas y reacciones gastrointestinales (diarrea y dolor abdominal). Véase, por ejemplo, Sanderson K. *et al.*, J Clin Oncol 23: 741-750, 2005.

En otro estudio, catorce pacientes con melanoma metastásico recibieron una administración intravenosa de un anticuerpo anti-CTLA4 completamente humano (MDX-010) a 3 mg/kg cada 3 semanas según se toleraba, junto con una vacunación subcutánea con dos péptidos modificados de glicoproteína 100 (gp100) con restricción 0201 del antígeno leucocitario humano A (HLA-A). Los resultados indicaron que aunque tres pacientes tenían una regresión objetiva del cáncer, seis pacientes (43%) desarrollaron eventos autoinmunes que incluían tres pacientes con dermatitis, dos con colitis/enterocolitis y uno con hepatitis, y todos ellos estaban autolimitados o eran sensibles a esteroides sistémicos. (G. Q. Phan *et al.*, Proc Am Soc Clin Oncol 22: página 852, 2003, Resumen 3424). Estos datos sugieren que CTLA4 puede tener un beneficio terapéutico, sin embargo, una administración sistémica de anticuerpo anti-CTLA4 que sea suficiente para conseguir una eficacia en un entorno clínico, puede tener una toxicidad relacionada. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar composiciones que superen la toxicidad potencial permitiendo un nivel sistémico menor de anticuerpo anti-CTLA4 que también sea eficaz.

### Compendio de la invención

La invención proporciona composiciones celulares para inmunoterapia para la generación de una respuesta inmune frente al cáncer en un sujeto humano, en donde las composiciones de inmunoterapia basadas en células incluyen un antígeno tumoral y una o varias poblaciones de células en donde al menos una de las poblaciones de células está modificada genéticamente para expresar la secuencia que codifica un polipéptido del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y en donde al menos una de las poblaciones de células está modificada genéticamente para expresar la secuencia que codifica un anticuerpo del antígeno 4 asociado con linfocitos T citotóxicos (CTLA4), en donde las cantidades del antígeno tumoral, el polipéptido de GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4 son terapéuticamente eficaces para generar una respuesta inmune frente al cáncer en el sujeto humano. En esta memoria se describen métodos para emplear las mismas composiciones para el tratamiento del cáncer en un paciente. Después de la administración de la composición para inmunoterapia basada en células a un sujeto humano, se detecta una respuesta inmune contra el al antígeno tumoral en donde la respuesta inmune no se detecta en el sujeto humano antes de la administración de la composición celular.

En un aspecto, el antígeno tumoral es expresado por una célula y la célula está modificada genéticamente.

La misma población o diferentes poblaciones de células se pueden modificar genéticamente para expresar la secuencia que codifica el polipéptido de GM-CSF o un anticuerpo anti-CTLA4.

En un aspecto, una población de células que expresa el antígeno tumoral se modifica genéticamente para expresar la secuencia que codifica tanto un polipéptido de GM-CSF como un anticuerpo anti-CTLA4.

Las células modificadas genéticamente pueden ser autólogas, alogénicas o con efecto vecindad y pueden expresar o no un antígeno tumoral.

Una población de células autólogas, alogénicas o con efecto vecindad que expresa un antígeno tumoral se puede modificar genéticamente para expresar la secuencia que codifica una citocina, tal como GM-CSF.

Una población de células autólogas, alogénicas o con efecto vecindad que expresa un antígeno tumoral se puede modificar genéticamente para expresar la secuencia que codifica una citocina, tal como GM-CSF, y un anticuerpo anti-CTLA4.

Una población de células autólogas, alogénicas o con efecto vecindad que expresa un antígeno tumoral se puede modificar genéticamente para expresar la secuencia que codifica un anticuerpo anti-CTLA4.

### Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 representa un vector retrovírico denominado vector de transferencia anti-CTLA4, cuya construcción se describe en el Ejemplo 1.

Las Figuras 2A y 2B ilustran un esquema del estudio (Fig. 2A) y los resultados (Fig. 2B) demostrando que un anticuerpo anti-CTLA4 expresado por una composición de inmunoterapia contra el cáncer que expresa citocinas transducidas de forma retrovírica, es funcional y aumenta la expansión de linfocitos T transgénicos transferidos de forma pasiva después de la inmunización con ovoalbúmina purificada. El día -2,  $1-3 \times 10^6$  esplenocitos procedentes de ratones transgénicos DO11.01, que producen linfocitos T específicos del péptido OVA<sub>323-339</sub>, se transfirieron de manera pasiva en ratones receptores Balb/c mediante administración iv. El día 0, los ratones fueron inyectados con 500 µg de antígeno sustituto, ovoalbúmina y posteriormente se administraron 100 µg por vía subcutánea (SC) dorsal de: un anticuerpo testigo IgG2b (ISOTIPO); un anticuerpo anti-CTLA4 purificado a partir de 9D9 que expresaba un

hibridoma (Hibridoma); un anticuerpo anti-CTLA4 purificado a partir de B16F10 transducido con retrovirus que expresaba el anticuerpo anti-CTLA4 (2A-anti-CTLA4); o vehículo (SIN TRATAR) los días 0 y 1. El día 4, se sacrificaron los ratones, se extirparon el bazo y los ganglios linfáticos, y se determinó el número de transgénicos DO11.01 utilizando el anticuerpo monoclonal KJ126 específico de DO11.01. Se muestra el número absoluto de linfocitos T CD8 específicos de ovoalbúmina en el bazo (Fig. 2B).

Las Figuras 3A y B muestran los resultados de un estudio en ratones C57B1/6 que muestra que la administración de una inmunoterapia contra el cáncer que expresa citocinas que también expresa localmente un anticuerpo anti-CTLA4 produce como resultado una expresión *in vivo* a largo plazo, sostenible, del anticuerpo anti-CTLA4. El Día 0, los ratones fueron inoculados por vía subcutánea (SC) con  $2 \times 10^5$  células tumorales B16F10 vivas. El Día 1, los ratones se dividieron en 5 grupos diferentes: recibiendo cada grupo una única administración intraperitoneal (ip) de 15  $\mu$ g, 50  $\mu$ g o 150  $\mu$ g de anticuerpo anti-CTLA4 purificado, respectivamente; un grupo fue inmunizado (SC) con  $1 \times 10^6$  células tumorales B16F10 irradiadas modificadas genéticamente para expresar GM-CSF; y el último grupo fue inmunizado (SC) con  $1 \times 10^6$  células tumorales B16F10 irradiadas modificadas genéticamente para expresar GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4 (Fig. 3B), y los niveles séricos de anticuerpo anti-CTLA4 se controlaron durante un período de 18 días.

La Figura 4 muestra un gráfico de Kaplan-Meier de los resultados de un estudio en un modelo de tumor CT26 en ratón BALB/c que mostraba que la inmunoterapia del cáncer que expresa citocinas transducidas con retrovirus, que expresa el anticuerpo anti-CTLA4, mejora la supervivencia de los animales portadores del tumor con menores concentraciones sistémicas de anticuerpo. El Día 0, los ratones BALB/c fueron inoculados por vía subcutánea con  $5 \times 10^5$  células tumorales vivas CT26. Tres días después, los ratones fueron inmunizados con  $1 \times 10^6$  células CT-26 irradiadas que secretaban GM-CSF, o con el mismo número de células CT-26 irradiadas que secretaban tanto GM-CSF como anticuerpo anti-CTLA4. Los grupos testigo se inmunizaron el Día 3 con  $1 \times 10^6$  células tumorales CT-26 irradiadas que secretaban GM-CSF, y la administración sistémica (intraperitoneal - 150  $\mu$ g, 10  $\mu$ g) o local (mezclada con la inmunoterapia contra el cáncer que expresaba citocinas - 10  $\mu$ g SC) de anticuerpo anti-CTLA4 recombinante. Los ratones fueron sometidos a inmunizaciones repetidas e inyecciones de anticuerpo los Días 13 y 27. Los ratones se vigilaron dos veces por semana para detectar la formación de tumores palpables, y se sacrificaron si los tumores se volvieron necróticos o superaron un tamaño de 1500 mm<sup>3</sup>.

Las Figuras 4B y 4C muestran la concentración de anticuerpo anti-CTLA4 presente en el suero de animales recogido el Día 3 después de la administración del anticuerpo en la Fig. 4A.

La Figura 5A muestra un gráfico de Kaplan-Meier que ilustra que la expresión local de un anticuerpo anti-CTLA4 procedente de células tumorales que expresan citocinas, transducido con retrovirus mejoraba la supervivencia de animales portadores de tumores en el modelo de melanoma B16F10. El Día 0, ratones C57BL/6 fueron estimulados con  $2 \times 10^5$  células tumorales B16F10 vivas. Los ratones se inmunizaron el Día 1 con  $3 \times 10^6$  células tumorales B16F10 irradiadas secretoras de GM-CSF, o con el mismo número de células B16F10 irradiadas secretoras de GM-CSF y anticuerpo anti-CTLA4. Un grupo distinto se inmunizó con células tumorales irradiadas secretoras de GM-CSF, y la administración sistémica (intraperitoneal) de anticuerpo recombinante los Días 2 (150  $\mu$ g) y 5 (100  $\mu$ g). Se administró una segunda ronda de inmunizaciones e inyecciones de anticuerpos a partir del día 14. La carga tumoral se vigiló y los ratones fueron sacrificados cuando los tumores estimulados llegaron a 1500 mm<sup>3</sup> o se desarrolló una ulceración grave.

Las Figuras 5B y 5C muestran la concentración de anticuerpo anti-CTLA4 presente en el suero de animales, recogido en días determinados después de la administración sistémica o local de anticuerpo expresado en la Fig. 5A.

Las Figuras 6A y 6B muestran los resultados de un estudio que muestra que la expresión local de un anticuerpo anti-CTLA4 a partir de células tumorales transducidas con retrovirus que expresan citocinas, da como resultado respuestas mejoradas de los linfocitos T. Ratones satélite procedentes de los grupos tratados tal y como se describe en la Figura 5, se recogieron el Día 21. Las respuestas específicas del antígeno se numeraron mediante un ensayo ELISPOT de IFN-gamma (R&D Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esplenocitos con eritrocitos agotados ( $5 \times 10^5$ ) se colocaron en placas y se incubaron durante 24 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> con 1  $\mu$ M de la Kb del péptido de unión obtenido a partir de TRP2 (SVYDFVWL) (SEQ ID NO: 11; Fig. 6A.) o  $5 \times 10^5$  células B16F10 irradiadas (Fig. 6b). Los puntos positivos se contaron usando un servicio de escaneo automático de placas.

Las Figuras 7A y B muestran los resultados de un estudio en ratones C57B1/6 que muestra que la administración de una inmunoterapia contra el cáncer que expresa citocinas que también expresa localmente anticuerpo anti-CTLA4 furina 2A (F2A) da como resultado una expresión del anticuerpo anti-CTLA4 a largo plazo, sostenible, *in vivo*. El Día 0, los ratones fueron inoculados por vía subcutánea (SC) con  $2 \times 10^5$  células tumorales B16F10 vivas. El Día 1, los ratones se dividieron en 4 grupos distintos: recibiendo cada grupo una única administración intraperitoneal (ip) de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) (círculos blancos);  $3 \times 10^6$  células tumorales B16F10 irradiadas modificadas genéticamente para expresar GM-CSF (B16GM; cuadrados negros);  $3 \times 10^6$  células B16GM irradiadas más una inyección sistémica de CTLA4 ( $\alpha$ -CTLA4 sistémico de B16GM; triángulos blancos); o  $3 \times 10^6$  células B16GM irradiadas modificadas genéticamente para secretar anti-CTLA4 utilizando un casete F2A (rombos blancos). En los momentos de tiempo indicados, se recogió suero y se evaluaron los niveles de anticuerpos de ADN anti-nuclear (Fig.

7A), ADN monocatenario (ADNss) (Fig. 7B) y ADN bicatenario (ADNds) (Fig. 7C), mediante ELISA.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

5 La puesta en práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante, genética, inmunología, biología celular, cultivo celular y biología transgénica, que están a nivel de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning*, 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook y Russell, 2001, *Molecular Cloning*, 3ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Ausubel *et al.*, 1992, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, incluyendo actualizaciones periódicas); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Anand, 1992, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, Academic Press, Nueva York; Guthrie y Fink, 1991, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Academic Press, Nueva York; Harlow y Lane, 1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Jakoby y Pastan, 1979; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins compiladores. 1984); 10 *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins compiladores. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado, "Methods In Enzymology" (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos compiladores., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer y Walker, compiladores, Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, compiladores, 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Hogan *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

15 A menos que se indique lo contrario, todos los términos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el que emplearía un experto en la técnica y la puesta en práctica de la presente invención empleará técnicas convencionales de microbiología y tecnología de ADN recombinante, que conocen los expertos de la técnica.

20 En la descripción de la presente invención, se emplean los siguientes términos que están destinados a ser definidos tal y como se indica a continuación.

25 La expresión "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos ("polinucleótidos") en forma monocatenaria o de cadena doble. A menos que se limite específicamente, la expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una molécula/polinucleótido de ácido nucleico particular abarca también implícitamente variantes modificadas de manera conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. 30 Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden obtener mediante la generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o varios codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de bases mixtas y/o de desoxiinosina (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). Los nucleótidos se indican por sus bases mediante las siguientes abreviaturas convencionales: adenina (A), citosina (C), timina (T) y guanina (G)

35 Las expresiones "vector", "vector de polinucleótido", "estructura artificial de vector de polinucleótido", "estructura artificial de vector de ácido nucleico" y "estructura artificial de vector" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier estructura artificial de ácido nucleico para la transferencia génica, tal como lo entiende un experto en la materia.

40 En un enfoque, el vector es un vector vírico. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vector vírico" se utiliza de acuerdo con su significado reconocido en la técnica. Se refiere a una estructura artificial de vector de ácido nucleico que incluye al menos un elemento de origen vírico y se puede empaquetar en una partícula de vector vírico. Las partículas de vectores víricos se pueden utilizar con el fin de transferir ADN, ARN o de otros ácidos nucleicos a células *in vitro* o *in vivo*.

45 Las expresiones "virus", "partícula vírica", "partícula de vector", "partícula de vector vírico" y "virión" se utilizan intercambiamente y han de entenderse en términos generales en el sentido de partículas víricas infecciosas que se forman cuando, por ejemplo, un vector vírico de la invención se transduce en una célula o una línea celular apropiada para la generación de partículas infecciosas. Las partículas víricas de acuerdo con la invención se pueden utilizar con el fin de transferir ADN a las células, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los vectores utilizados en la presente invención pueden codificar opcionalmente un marcador seleccionable.

50 Un "vector de adenovirus" o un "vector adenovírico" (usado de forma intercambiable) tal y como se refiere en el presente documento, es una estructura artificial de polinucleótido que se puede empaquetar en un virión de adenovirus. Vectores adenovíricos a modo de ejemplo de la invención incluyen, pero no se limitan a, ADN, ADN encapsulado en una cubierta de adenovirus, ADN adenovírico empaquetado en otra forma vírica o de tipo vírico

(como el herpes simple y el VAA), ADN adenovirico encapsulado en liposomas, ADN adenovirico que forma complejos con polilisina, ADN adenovirico que forma complejos con moléculas policatiónicas sintéticas, conjugado con transferrina, o que forma complejos con compuestos tales como PEG, para "enmascarar" inmunológicamente la antigenicidad y/o aumentar la semivida, o conjugado con una proteína no vírica.

5 Un "marcador seleccionable" es una proteína cuya expresión en una célula proporciona a la célula una ventaja selectiva. La ventaja selectiva que poseen células transformadas con el gen marcador seleccionable puede ser debida a su capacidad para crecer en presencia de un agente selectivo negativo, tal como un antibiótico, en comparación con el crecimiento de las células no transducidas. La ventaja selectiva que poseen las células transformadas, en comparación con las células no transducidas, también puede ser debida a su mayor capacidad o  
10 nueva capacidad para utilizar un compuesto añadido, tal como un nutriente, un factor de crecimiento o una fuente de energía. Las proteínas marcadoras selectivas incluyen aquellas que permiten la detección de las células transducidas y, posiblemente, su separación de las células no transducidas. Aunque se puede utilizar cualquier marcador seleccionable, los marcadores seleccionables para emplear en tales vectores de expresión son generalmente conocidos en la técnica y la elección del marcador seleccionable adecuado dependerá de la célula  
15 hospedadora y de la aplicación. Por ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP) se puede utilizar como un marcador seleccionable. Ejemplos de genes marcadores seleccionables que codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, incluyen ampicilina, metotrexato, tetraciclina, neomicina (Southern *et al.*, J Mol Appl Genet 1982; 1(4):327 41 (1982)), ácido micofenólico (Mulligan *et al.*, Science 209:1422 7 (1980)), puromicina, zeomicina, higromicina (Sugden *et al.*, Mol Cell Biol 5(2):410 3 (1985)) o G418.

20 El término "transducción" se refiere a la entrega de una molécula de ácido nucleico a una célula receptora tanto *in vivo* como *in vitro* a través de la infección, la internalización, la transfección o cualquier otro medio. La transfección se puede llevar a cabo por una variedad de medios conocidos en la técnica, incluyendo la coprecipitación de ADN con fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y  
25 biolística, véase Graham *et al.* (1973) Virology, 52:456, Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis *et al.* (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, y Chu *et al.* Gene 13:197, 1981. Tales técnicas se pueden emplear para introducir uno o varios restos de ADN exógeno, tal como un vector de plásmido y otras moléculas de ácido nucleico, en células hospedadoras adecuadas. El término se refiere a la captación tanto estable como temporal del material genético.

30 El término "recombinante", tal y como se usa en la presente memoria, haciendo referencia a moléculas de ácido nucleico, se refiere a una combinación de moléculas de ácido nucleico que se unen entre sí usando tecnología de ADN recombinante, en una molécula de ácido nucleico de la progenie. Tal como se usa en el presente documento haciendo referencia a virus, células y organismos, los términos "recombinante", "transformado" y "transgénico" se refieren a un virus, una célula o un organismo hospedador en el que se ha introducido una molécula de ácido  
35 nucleico heteróloga o se ha eliminado o modificado una secuencia de ácido nucleico natural. En el caso de la introducción de una molécula de ácido nucleico heterólogo, la molécula de ácido nucleico se puede integrar de forma estable en el genoma del hospedador o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Una molécula extracromosómica de este tipo puede ser autorreplicante. Virus, células y organismos recombinantes se entiende que abarcan no solo el producto final de un proceso de transformación, sino  
40 también la progenie recombinante del mismo. Un hospedador "no transformado", "no transgénico" o "no recombinante" se refiere a un virus de tipo silvestre, una célula o un organismo que no contiene la molécula de ácido nucleico heteróloga.

Los "elementos reguladores" son secuencias implicadas en el control de la expresión de una secuencia de nucleótidos. Los elementos reguladores incluyen promotores, potenciadores y señales de terminación. También  
45 incluyen típicamente secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia de nucleótidos.

El término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN no traducida que normalmente se encuentra aguas arriba de la región codificante que contiene el sitio de unión para la polimerasa II de ARN e inicia la transcripción del ADN. La región promotora puede incluir también otros elementos que actúan como reguladores de la expresión génica. La expresión "promotor mínimo" se refiere a un elemento promotor, particularmente un elemento TATA que es inactivo  
50 o que ha reducido en gran medida la actividad promotora en ausencia de elementos de activación aguas arriba.

El término "potenciador" en el sentido de la invención puede ser cualquier elemento genético, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que incrementa la transcripción de una secuencia codificante ligada funcionalmente a un promotor, en un mayor grado que la activación de la transcripción efectuada por el promotor mismo cuando se liga funcionalmente a la secuencia codificante, es decir, incrementa la transcripción desde el promotor.

55 Una secuencia de nucleótidos está "ligada funcionalmente" o "ligada operativamente" (usado de forma intercambiable) cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, se dice que una secuencia de ADN promotora o reguladora está "ligada funcionalmente" a una secuencia de ADN que codifica un ARN o una proteína, si las dos secuencias están situadas de modo que la secuencia de ADN promotora o reguladora afecta al nivel de expresión de la secuencia de ADN codificadora o estructural. Secuencias de ADN  
60 ligadas funcionalmente son típicamente contiguas, pero no necesariamente.

El término "expresión" se refiere a la transcripción y/o la traducción de un gen endógeno, transgén o región codificante en una célula. En el caso de una estructura artificial no codificante (del inglés "antisense"), la expresión se puede referir a la transcripción de solo el ADN no codificante. Los vectores de la invención contienen una secuencia que codifica una proteína o fragmentos de la misma (por ejemplo, anticuerpo anti-CTLA4, antígeno tumoral, GM-CSF). Las secuencias codificantes están ligadas funcionalmente a un promotor heterólogo que será activo de forma constitutiva o inducible en la célula diana, junto con otros elementos de control y una secuencia poli-

5 A necesaria para la transcripción y la traducción de la proteína. Cuando se modifican genéticamente vectores para la expresión de antígenos, el vector de expresión puede contener secuencias que dirigen la localización celular del antígeno. Por ejemplo, la expresión del antígeno puede ser citosólica; se pueden emplear secuencias señal para la

10 secreción o secuencias para una asociación estable con la membrana externa de la célula. Para la última realización, un vector codifica un antígeno y una región transmembranal en el mismo marco de lectura abierto, en donde la región transmembranal puede estar aguas arriba o aguas abajo de la región que codifica el antígeno y, opcionalmente, está separada por una región espaciadora en marco. La región transmembranal se puede utilizar en un modelo con otras proteínas transmembranales conocidas, o ser un segmento de polipéptido diseñado

15 artificialmente con un alto grado de lipofilia. En algunas realizaciones, se puede utilizar una combinación de patrones de expresión, ya sea en la misma célula o en poblaciones de células distintas. El casete de expresión formado de este modo se introduce en la célula a través de cualquier método conocido en la técnica, tal como precipitación con fosfato de calcio, inserción utilizando liposomas catiónicos o empleando un vector vírico trópico para las células.

La expresión "actividad promotora selectiva tumoral" tal y como se usa en esta memoria significa que la actividad promotora de un fragmento del promotor es más activa en las células tumorales que en tipos de células no tumorales.

Un "sitio de escisión por autoprocésamiento" o una "secuencia de escisión por autoprocésamiento" tal y como se refiere en el presente documento, es una secuencia de ADN o de aminoácidos, en la que después de la traducción, tiene lugar una rápida escisión intramolecular (cis) de un polipéptido que comprende el sitio de escisión por

25 autoprocésamiento para dar como resultado la expresión de una proteína madura o polipéptido productos distintos. Un sitio de escisión por autoprocésamiento muestra un efecto sobre la traducción modificando la actividad del ribosoma para favorecer la hidrólisis de un enlace éster, liberando de este modo el polipéptido del complejo de traducción de una manera que permite que se produzca la síntesis de un producto de la traducción distinto, aguas abajo (Donnelly *et al.* J Gen Virol mayo 2001; 82(Pt 5):1013-25). Alternativamente, un sitio, una secuencia o un

30 dominio 2A muestra una "autoproteólisis" o una "escisión" escindiendo su propio extremo C-terminal en cis, para producir productos primarios de la escisión (Furler; Palmenberg, Ann Rev. Microbiol. 44:603-623 (1990)).

Tal y como se usa en este documento, la expresión "sitio de escisión proteolítica adicional", se refiere a una secuencia que se incorpora en una estructura artificial de expresión de la invención, de forma adyacente a un sitio de escisión por autoprocésamiento, tal como una secuencia 2A o similar a 2A, y proporciona un medio para eliminar

35 aminoácidos adicionales que permanecen después de la escisión mediante la secuencia de escisión por autoprocésamiento. "Sitios de escisión proteolítica adicionales" ejemplares se describen en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, los sitios de escisión de furina con la secuencia de consenso RXK(R)R (SEQ ID NO: 10). Tales sitios de escisión de furina se pueden escindir con proteasas endógenas de tipo subtilisina, tales como furina y otras proteasas de serina dentro de la ruta de secreción de la proteína.

Tal y como se usa en este documento, los términos "inmunoglobulina" y "anticuerpo" se pueden usar indistintamente y se refieren a moléculas de inmunoglobulina o de anticuerpo intactas así como a fragmentos de las mismas, tales como Fa, F(ab')<sub>2</sub> y Fv, que son capaces de unirse a un determinante antigénico. Una "inmunoglobulina" y "anticuerpo" de este tipo se componen de dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas, con un peso molecular de

40 aproximadamente 23.000 dalton, y dos cadenas pesadas idénticas de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas se unen mediante enlaces disulfuro en una configuración en forma de "Y". Las cadenas pesadas se clasifican en gamma (IgG), mu (IgM), alfa (IgA), delta (IgD) o épsilon (IgE) y son la base de las designaciones de clases de inmunoglobulinas, que determina la función efectora de un anticuerpo dado. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda. Cuando se hace referencia en esta memoria a una "inmunoglobulina o un fragmento de la misma", se entenderá que un "fragmento de la misma" de este tipo es un fragmento de inmunoglobulina

50 inmunológicamente funcional.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula de anticuerpo en la que uno o varios aminoácidos de las regiones que se unen a antígeno de un anticuerpo no humano, han sido reemplazados con el fin de parecerse más estrechamente a un anticuerpo humano, a la vez que conserva la actividad de unión del anticuerpo original no humano. Véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. nº 6.602.503.

La expresión "determinante antigénico", tal y como se usa en esta memoria, se refiere a aquel fragmento de una molécula (es decir, un epítipo) que se pone en contacto con un anticuerpo particular. Numerosas regiones de una proteína o de un fragmento de una proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región dada de la estructura tridimensional de la proteína. Estas regiones o estructuras se denominan determinantes antigénicos. Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (es decir,

60 el inmunógeno utilizado para provocar la respuesta inmune) en la unión a un anticuerpo.

El término "fragmento", cuando se refiere a una proteína o a un polipéptido recombinante de la invención, significa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma que parte, pero no toda, la secuencia de aminoácidos de la proteína o el polipéptido de longitud completa, y que conserva al menos una de las funciones o actividades de la proteína o el polipéptido de longitud completa correspondiente. El fragmento incluye preferiblemente al menos 20-100 residuos de aminoácidos contiguos de la proteína o el polipéptido de longitud completa.

Un "transcrito multicistrónico" se refiere a una molécula de ARNm que contiene más de una región que codifica proteínas, o cistrón. Un ARNm que comprende dos regiones codificantes se denomina un "transcrito bicistrónico". La región codificadora o cistrón "5'-proximal" es la región codificadora cuyo codón de iniciación de la traducción (generalmente AUG) está más próximo al extremo 5' de una molécula de ARNm multicistrónico. Una región codificadora o cistrón "5'-distal" es una cuyo codón de iniciación de la traducción (generalmente AUG) no es el codón de iniciación más cercano al extremo 5' del ARNm. Los términos "5'-distal" y "aguas abajo" se utilizan como sinónimos para referirse a regiones codificadoras que no son adyacentes al extremo 5' de una molécula de ARNm.

Tal y como se usa en este documento, "cotranscrito" significa que dos (o más) regiones codificantes o polinucleótidos están bajo el control transcripcional de un solo elemento de control regulador o transcripcional.

Tal y como se usa en este documento, un "sitio interno de entrada al ribosoma" o "IRES" se refiere a un elemento que favorece la entrada interna directa en el ribosoma al codón de iniciación, tal como ATG, de un cistrón (una región que codifica una proteína), lo que producirá la traducción del gen de forma independiente de cap. Jackson R J, Howell M T, Kaminski A (1990) Trends Biochem Sci 15(12):477-83) y Jackson R J y Kaminski, A. (1995) ARN 1(10):985-1000). La presente invención incluye el uso de cualquier elemento IRES, que sea capaz de favorecer la entrada interna directa en el ribosoma al codón de iniciación de un cistrón. "Bajo control traduccional de un IRES" tal y como se usa en esta memoria, significa que la traducción está asociada con el IRES y procede de una manera independiente de cap. Ejemplos de "IRES" conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a IRES obtenibles a partir de picornavirus (Jackson *et al.*, 1990, Trends Biochem Sci. 15(12): 477-483); e IRES que se pueden obtener a partir de fuentes de ARNm vírico o celular, tales como por ejemplo, la proteína que se une a la cadena pesada de inmunoglobulina (BiP), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Huez *et al.* (1998) Mol. Cell. Biol. 18(11):6178-6190), el factor de crecimiento de fibroblastos 2, y el factor de crecimiento similar a la insulina, el factor de iniciación de la traducción eIF4G, los factores de transcripción de levadura TFIID y HAP4. Tal y como se usa en esta memoria, "IRES" abarca variaciones funcionales de secuencias de IRES, siempre y cuando la variación sea capaz de promover la entrada interna directa en el ribosoma al codón de iniciación de un cistrón. En realizaciones preferidas, el IRES es de mamífero. En otras realizaciones, el IRES es vírico o protozoario. Ejemplos de secuencias IRES se describen en el documento de patente de EE.UU. 6.692.736.

Las expresiones "secuencia que codifica" y "región codificante" se refieren a una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN tal como ARNm, ARNr, ARNt, ARNsn, ARN codificante o no codificante. En una realización, el ARN se traduce a continuación en una célula para producir una proteína.

La expresión "inhibir el crecimiento tumoral" o "inhibición del crecimiento tumoral" se refiere a cualquier disminución medible de la masa tumoral, el volumen del tumor, la cantidad de células tumorales o la tasa de crecimiento del tumor. Con la definición se entiende que incluye cualquier disminución del tamaño, la potencia o la tasa de crecimiento de un tumor preexistente. Esto incluye la supresión, la regresión o la desaparición parcial o completa de un tumor preexistente. También, se incluye en la definición, la inhibición o la ralentización del aumento del tamaño del tumor o del número de células tumorales, o la reducción del número de células tumorales, el tamaño del tumor o el número de tumores.

Con la expresión "antígeno de una célula tumoral" o equivalentes gramaticales de la misma, se entiende en esta memoria cualquier proteína, carbohidrato u otro componente procedente de una célula tumoral, capaz de provocar una respuesta inmune. La definición incluye, pero no se limita a, el uso de toda la célula tumoral con todos sus antígenos asociados como un antígeno, así como de cualquier componente distinto procedente del cuerpo de la célula, tal como una membrana plasmática, proteínas citoplasmáticas, proteínas transmembranales, proteínas purificadas a partir de la superficie de la célula o de la membrana, o restos de carbohidratos únicos asociados con la superficie celular. La definición también incluye los antígenos de la superficie de la célula que requieren un tratamiento especial de las células para entrar. Se incluyen fragmentos de proteínas que aún contienen epítopos inmunológicos. Un experto en la técnica puede determinar fragmentos inmunogénicos de las proteínas tal y como se describen en el presente documento.

La expresión "célula tumoral modificada genéticamente" tal como se utiliza en esta memoria se refiere a una composición que comprende una población de células que se ha modificado genéticamente para expresar un transgén, y que se administra a un paciente como parte de un régimen de tratamiento del cáncer. La inmunoterapia del cáncer con células tumorales modificadas genéticamente comprende células tumorales que son "autólogas" o "alógenicas" para el paciente sometido a tratamiento o "células con efecto de vecindad", que se mezclan con células tumorales tomadas del paciente. Una inmunoterapia del cáncer con células tumorales modificadas genéticamente que expresan GM-CSF, también se conoce como "GVAX®".

Con la expresión "respuesta inmune sistémica" o equivalentes gramaticales en esta memoria, se entiende una respuesta inmune que no está localizada, sino que afecta al individuo como un todo, lo que permite respuestas posteriores específicas al mismo estímulo.

5 La expresión "célula tumoral primaria", tal y como se usa en el presente documento, es una célula de cáncer que se aísla a partir de un tumor en un mamífero y que no se ha cultivado extensivamente *in vitro*.

10 La expresión "expresión mejorada" o "modificada" para expresar, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una célula que produce niveles más elevados de una proteína, un péptido, un ARNm o un antígeno particular (por ejemplo, proteína angiogénica, antígeno tumoral o citocina) de los que se producirían en una célula de origen natural o la célula progenitora a partir de la cual se ha obtenido. Las células se pueden modificar genéticamente para incrementar la expresión de una proteína endógena o un ARNm, utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como la modificación genética de regiones promotoras de secuencias genómicas, alterando genéticamente rutas de señalización celular para aumentar la producción de la proteína o el ARNm, o mediante la transducción con un vector que codifica una proteína, un polipéptido o un péptido de interés (por ejemplo, un antígeno tumoral, una proteína angiogénica o una citocina). El término "citocina" o "citocinas" tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a la clase general de moléculas biológicas, que afectan a células del sistema inmune. La definición que incluye, pero no se limita a, aquellas moléculas biológicas que actúan localmente o que pueden circular en la sangre, y que, cuando se utilizan en las composiciones o los métodos de la presente invención, sirven para regular o modular una respuesta inmune de un individuo frente al cáncer. Ejemplos de citocinas incluyen, pero no se limitan a, IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gamma, interleucinas (por ejemplo, IL-1 a IL-29, en particular, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 e IL-18), factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF-alfa y TNF-beta), eritropoyetina (EPO), MIP3a, ICAM, factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). La composición celular de la invención comprende al menos una población de células que está modificada genéticamente para expresar la secuencia que codifica GM-CSF.

25 La expresión "respuesta inmune incrementada", tal y como se usa en el presente documento significa que un aumento detectable de una activación inmune específica es detectable (por ejemplo, un incremento de la respuesta de los linfocitos B y/o linfocitos T). Un ejemplo de una respuesta inmune incrementada es el incremento de la cantidad de un anticuerpo que se une a un antígeno de una célula tumoral. Otro ejemplo es un aumento de una respuesta inmune celular. Una respuesta inmune celular implica los linfocitos T, y se puede observar *in vitro* (por ejemplo, medida por un ensayo de liberación de cromo) o *in vivo*. Una respuesta inmune incrementada está acompañado normalmente por un aumento de una población específica de células inmunes.

35 El término "administrado" se refiere a cualquier método que introduce las células de la invención (por ejemplo, una vacuna contra el cáncer) en un mamífero. Este incluye, pero no está limitado a una administración oral, parenteral, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intranasal, intravenosa (que incluye a través de un catéter permanente), intratumoral, a través de un vaso linfático aferente, o por otra ruta que sea adecuada dependiendo del tumor que se está tratando y del estado del mamífero. Las composiciones de esta invención se pueden administrar al sujeto en cualquier sitio. Por ejemplo, se pueden entregar en un sitio que sea "distal" o "distante" del tumor primario.

40 Las expresiones "tratamiento", "uso terapéutico" o "uso medicinal", tal y como se emplean en este documento, se referirán a cualquiera y a todos los usos de las composiciones reivindicadas que remedian un estado de enfermedad o los síntomas, o que previenen, impiden, retrasan o revierten de otra manera la progresión de la enfermedad o de otros síntomas indeseables, de cualquier modo.

45 Con la expresión "inversión de un tumor establecido" o equivalentes gramaticales, se entiende en esta memoria la supresión, la regresión o la desaparición parcial o completa de un tumor preexistente. La definición incluye cualquier disminución del tamaño, la potencia o la tasa de crecimiento de un tumor preexistente.

50 Con la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o equivalentes gramaticales, esta memoria se refiere a una cantidad de la preparación que es suficiente para modular la respuesta inmune sistémica de un individuo o una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento tumoral. Esta cantidad puede ser diferente para diferentes individuos, diferentes tipos de tumores y diferentes preparaciones. La "cantidad terapéuticamente eficaz" se determina usando procedimientos empleados habitualmente por los expertos en la técnica, de modo que se produce un "resultado terapéutico mejorado".

55 Tal y como se usa en esta memoria, las expresiones "resultado terapéutico mejorado" y "eficacia terapéutica mejorada", en relación con el cáncer, se refieren a una ralentización o disminución del crecimiento de células cancerosas o un tumor sólido, o una reducción del número total de células cancerosas o la carga tumoral total. Un "resultado terapéutico mejorado" o una "eficacia terapéutica mejorada", significa por lo tanto que hay una mejora en el estado del individuo de acuerdo con cualquier criterio clínicamente aceptable, incluyendo la reversión de un tumor establecido, un aumento de la esperanza de vida o una mejora de la calidad de vida.

Con el término "individuo", "sujeto", "sujeto mamífero" o sus equivalentes gramaticales, se entiende cualquier

mamífero individual.

### Composiciones y métodos de la invención

La presente invención proporciona composiciones para inmunoterapia del cáncer basada en células que comprenden un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y un polipéptido de GM-CSF. En particular, la invención proporciona una composición celular para generar una respuesta inmune frente al cáncer en un sujeto humano, que comprende: un antígeno tumoral y una o varias poblaciones de células, en donde al menos una de las poblaciones de células está modificada genéticamente para expresar la secuencia que codifica un polipéptido del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y en donde al menos una de las poblaciones de células está modificada genéticamente para expresar la secuencia que codifica un anticuerpo anti-antígeno 4 asociado con linfocitos T citotóxicos (CTLA4), en donde las cantidades del antígeno tumoral, el polipéptido de GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4 son terapéuticamente eficaces para generar una respuesta inmune frente al cáncer en el sujeto humano. Las composiciones para inmunoterapia del cáncer basada en células de la invención se administran a un sujeto para estimular una respuesta inmune frente a un antígeno tumoral (cáncer) y/o para mejorar el resultado terapéutico en un paciente con cáncer, después de la administración de la inmunoterapia *in vivo*. En una realización, la composición para inmunoterapia del cáncer basada en células expresa una proteína que provocará una respuesta inmune frente a una célula tumoral y un anticuerpo anti-CTLA4 procedente de una sola célula. El sujeto es un ser humano y típicamente es un paciente humano con cáncer.

Aunque el mecanismo no forma parte de la invención, la eficacia de la inmunoterapia contra el cáncer basada en células de la invención puede ser debida a una respuesta inmune potenciada frente a uno o varios antígenos tumorales y/o el bloqueo de la inhibición dependiente de CTLA4, de la proliferación de linfocitos T en el sujeto que recibe la inmunoterapia contra el cáncer.

Deseablemente, la administración de la inmunoterapia contra el cáncer basada en células de la invención genera una respuesta inmune sistémica, es decir, una respuesta de linfocitos T y/o una respuesta de linfocitos B, contra el cáncer. En una realización, el método comprende: modificar genéticamente una célula para expresar al menos uno entre: un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y un polipéptido de GM-CSF; y administrar las células modificadas genéticamente a un sujeto, en donde las células expresan al menos un antígeno expresado por las células tumorales albergadas por células cancerosas presentes en el sujeto al que se administran las células. Las células modificadas genéticamente pueden ser células tumorales o cancerosas. Las células modificadas genéticamente se vuelven incompetentes para la proliferación antes de la administración, típicamente por radiación, aunque se puede emplear cualquier método conocido o descubierto posteriormente para hacer que las células sean incompetentes para la proliferación. Después de la administración al sujeto de las células tumorales modificadas genéticamente, se produce una respuesta inmune potenciada y/o la respuesta de los linfocitos T frente a las células cancerosas o tumorales.

La presente invención se basa en la observación de que la administración de una inmunoterapia contra el cáncer que expresa citocinas que comprende células tumorales que expresan GM-CSF que expresan adicionalmente de forma local un anticuerpo anti-CTLA4, muestra una supervivencia prolongada en animales portadores de tumores, en comparación con una monoterapia, y eso a niveles sistémicos de anticuerpo anti-CTLA4 significativamente más bajos (por ejemplo, véanse los Ejemplos 5 y 6).

### Células que expresan citocinas modificadas genéticamente

En un aspecto, la invención proporciona una composición para inmunoterapia contra el cáncer basada en células que comprende un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y una citocina que es GM-CSF. El antígeno tumoral y la citocina se expresan típicamente por o a partir de una célula. Pueden ser expresados por la misma célula o por células diferentes, y uno puede ser expresado por una célula mientras que el otro se proporciona en forma de la proteína natural o un fragmento biológicamente activo o una variante de la misma.

En una realización, una célula tumoral se modifica genéticamente para expresar GM-CSF y un anticuerpo anti-CTLA4. La célula tumoral se selecciona a partir del grupo que consiste en una célula tumoral autóloga, una célula tumoral alogénica y una línea de células tumorales. Las células tumorales se pueden transducir *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En la puesta en práctica de la presente invención, la célula tumoral puede ser una célula tumoral primaria o una línea celular tumoral, típicamente del mismo tipo que el tumor o el cáncer que se está tratando. En general, las células humanas y la línea celular se usan para la administración a pacientes humanos.

Las células cancerosas autólogas y alogénicas que se han modificado genéticamente para expresar una citocina, por ejemplo, GM-CSF, seguido de la administración a un individuo para el tratamiento del cáncer, se describen en los documentos de patente de EE.UU. n.º 5.637.483, 5.904.920 y 6.350.445. Se han realizado ensayos clínicos que emplean inmunoterapias contra el cáncer que expresan GM-CSF (GVAX) para el tratamiento del cáncer de próstata, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer renal y mieloma múltiple. Se ha descrito una variedad de ensayos clínicos que emplean estas inmunoterapias, más notablemente en melanoma y carcinoma de próstata, renal y pancreático, (Simons JW *et al.* Cancer Res. 1999; 59:5160-5168; Simons JW *et al.* Cancer Res. 1997; 57: 1537-1546; Soiffer R. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:13141-13146; Jaffee, *et al.* J Clin Oncol 2001; 19:145-

156; Salgia *et al.* J Clin Oncol 2003 21:624B30; Soiffer *et al.* J Clin Oncol 2003 21:3343B50; Nemunaitis *et al.* J Natl Cancer Inst. 18 de febrero 2004 96(4):326-31). Una línea celular con efecto vecindad, inmunomoduladora universal, modificada genéticamente se describe en el documento de patente de EE.UU. nº 6.464.973.

5 Después de la transducción, las células son irradiadas para volverlas incompetentes para la proliferación. Las células que expresan citocinas, incompetentes para la proliferación se administran de nuevo al paciente (por ejemplo, por la vía intradérmica o subcutánea) y por lo tanto actúan como una inmunoterapia contra el cáncer.

10 En un enfoque, las células tumorales modificadas genéticamente comprenden una única población de células que se modifica para expresar una citocina y un anticuerpo anti-CTLA4 y se administra a un sujeto como parte de un régimen de tratamiento. En otro enfoque, la misma población o dos o varias poblaciones de células tumorales modificadas genéticamente, se modifican para expresar un transgén diferente (por ejemplo, una citocina o un anticuerpo anti-CTLA4 diferentes) y se administran a un sujeto. El régimen de tratamiento puede incluir uno o varios agentes o tratamientos terapéuticos del cáncer adicionales.

15 En general, las células tumorales modificadas genéticamente para uso en la puesta en práctica de la invención incluyen una o varias de las células tumorales autólogas, células tumorales alogénicas y líneas celulares tumorales (es decir, células con efecto vecindad). Una inmunoterapia tumoral basada en células, de la invención puede comprender cualquier combinación de células tumorales autólogas, células tumorales alogénicas o células con efecto vecindad que expresan citocinas, junto con células tumorales autólogas, células tumorales alogénicas o células con efecto vecindad que expresan una citocina diferente y un anticuerpo anti-CTLA4.

20 El tipo de tumor que se está tratando se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de vejiga, de mama, de colon, cáncer de cabeza y cuello, de riñón, de hígado, de pulmón, de ovario, de cuello uterino, de páncreas, de recto, de próstata, de estómago, de epidermis; un tumor hematopoyético de estirpe mieloide o linfocito; un tumor de origen mesenquimatoso tal como un fibrosarcoma o rhabdomyosarcoma; otros tipos de tumores tales como melanoma, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, adenocarcinoma y carcinoma de pulmón de células no pequeñas. Cuando el tipo de célula tumoral que se está tratando es cáncer de próstata, la línea celular de tumor de  
25 próstata se puede seleccionar entre el grupo que consiste en DU145, PC-3 y LnCaP.

### **Autólogo**

30 El uso de células tumorales autólogas que expresan citocinas ofrece ventajas ya que cada tumor del paciente expresa un conjunto único de antígenos tumorales que puede diferir de los que se encuentran en células tumorales histológicamente similares, que coinciden con el MHC de otro paciente. Véase, por ejemplo, Kawakami *et al.*, J. Immunol, 148, 638-643 (1992); Darrow *et al.*, J. Immunol, 142, 3329-3335 (1989); y Horn *et al.*, J. Immunother., 10, 153-164 (1991). En contraste, las células tumorales que coinciden con el MHC de una fuente diferente, proporcionan la ventaja de que el paciente no necesita sufrir una cirugía para obtener una muestra de su tumor con el fin de preparar una inmunoterapia contra el cáncer basada en células de la invención.

35 El uso de células tumorales autólogas que expresan citocinas proporciona ventajas ya que cada tumor del paciente expresa un conjunto único de antígenos tumorales que puede diferir de los que se encuentran en células tumorales histológicamente similares, que coinciden con el MHC de otro paciente. Véase, por ejemplo, Kawakami *et al.*, J. Immunol, 148, 638-643 (1992); Darrow *et al.*, J. Immunol, 142, 3329-3335 (1989); y Horn *et al.*, J. Immunother., 10, 153-164 (1991). En contraste, las células tumorales que coinciden con el MHC de una fuente diferente, proporcionan la ventaja de que el paciente no necesita sufrir una cirugía para obtener una muestra de su tumor con el fin de  
40 preparar una inmunoterapia contra el cáncer basada en células de la invención.

45 En un aspecto preferido, la presente invención comprende una composición celular para uso en un método de tratamiento del cáncer, mediante la realización de las etapas: (a) obtener células tumorales a partir de un sujeto mamífero que alberga un tumor; (b) modificar las células tumorales para hacerlas capaces de expresar un anticuerpo anti-CTLA4 y una citocina; (c) hacer que las células tumorales modificadas sean incompetentes para la proliferación; y (d) administrar de nuevo las células tumorales modificadas al sujeto mamífero a partir del cual se habían obtenido las células tumorales o a un mamífero con el mismo tipo de MHC que el mamífero a partir del cual se habían obtenido las células tumorales. Las células tumorales administradas son autólogas y coinciden con el MHC del hospedador. De acuerdo con la presente invención, el sujeto que se va a tratar es un ser humano. Preferiblemente, la composición se administra por vía subcutánea, intradérmica o intratumoral al sujeto. Una célula tumoral autóloga aislada puede expresar la secuencia que codifica un anticuerpo anti-CTLA4 y GM-CSF o un anticuerpo anti-CTLA4 y GM-CSF pueden ser expresados por diferentes células tumorales autólogas. En un aspecto de la invención, una célula tumoral autóloga se modifica mediante la introducción de uno o varios vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CTLA4 o GM-CSF, ligado funcionalmente a un promotor y a secuencias de expresión/control necesarias para la expresión de los mismos. En otro aspecto, la misma célula tumoral autóloga o una célula tumoral autóloga diferente se modifica por introducción de un vector que  
50 comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CTLA4 o GM-CSF ligado funcionalmente a un promotor y a secuencias de expresión/control necesarias para la expresión de los mismos. El ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CTLA4 o GM-CSF se introduce en la misma célula tumoral autóloga o en una célula tumoral autóloga diferente, utilizando el mismo vector o uno diferente. Deseablemente, las células tumorales autólogas expresan  
55

niveles elevados de una citocina, por ejemplo, GM-CSF.

### Alogénico

Los investigadores han buscado alternativas a las células autólogas y que coinciden con el MHC, como vacunas contra el cáncer, tal como ha sido revisado por Jaffee *et al.*, *Seminars in Oncology*, 22, 81-91 (1995). Estrategias tempranas de inmunoterapia contra tumores se basaban en el entendimiento de que las células tumorales para vacunación actúan como células presentadoras de antígeno (APC) que presentan antígenos tumorales en sus moléculas del MHC de clase I y II, y activan directamente el grupo de los linfocitos T del sistema inmune. Los resultados de Huang *et al.* (*Science*, 264, 961-965, 1994), indican que APCs expertas del hospedador en lugar de favorecer las células tumorales de vacunación, favorecen el grupo de linfocitos T del sistema inmune mediante la secreción de citocina(s) tal como GM-CSF, de modo que se reclutan las APCs obtenidas a partir de la médula ósea a la región del tumor. Las APCs obtenidas a partir de la médula ósea requieren toda la proteína celular del tumor para el procesamiento, y a continuación, presentan el péptido(s) antigénico(s) en sus moléculas del MHC de clase I y II, favoreciendo de esta manera los grupos de linfocitos T CD4+ y CD8+ del sistema inmune, lo que da como resultado una respuesta inmune sistémica antitumoral específica del tumor. Estos resultados sugieren que puede no ser necesario u óptimo utilizar células tumorales autólogas o que coinciden con el MHC con el fin de provocar una respuesta inmune contra el cáncer y que la transferencia de genes alogénicos del MHC (de un individuo genéticamente diferente de la misma especie) puede potenciar la inmunogenicidad del tumor. Más específicamente, en ciertos casos, el rechazo de tumores que expresaban moléculas alogénicas del MHC de clase I, dio lugar a respuestas inmunes sistémicas potenciadas frente a una estimulación subsiguiente con el tumor progenitor no modificado, tal como fue revisado en Jaffee *et al.*, *supra*, y Huang *et al.*, *supra*.

Tal y como se describe en el presente documento, una "línea celular tumoral" comprende células que se obtuvieron inicialmente a partir de un tumor. Tales células se transforman típicamente (es decir, muestran un crecimiento indefinido en cultivo). En un aspecto preferido, la invención proporciona una composición celular para uso en un método para tratar el cáncer mediante la realización de las etapas: (a) obtener una línea celular tumoral; (b) modificar la línea de células tumorales para hacer que las células sean capaces de expresar un anticuerpo anti-CTLA4 y GM-CSF; (c) hacer que la línea celular tumoral modificada sea incompetente para la proliferación; y (d) administrar la línea celular tumoral a un sujeto humano (hospedador) que tiene al menos un tumor que es un tumor del mismo tipo que el tumor a partir del cual se ha obtenido la línea celular tumoral. La línea de células tumorales administrada es alogénica y no coincide con el MHC del hospedador. Tales líneas alogénicas proporcionan la ventaja de que se pueden preparar con antelación, caracterizar, dividir en partes alícuotas en viales que contienen un número conocido de células que expresan transgenes y almacenar (es decir, congelar) de tal manera que las células bien caracterizadas están disponibles para la administración al paciente. Los métodos para la producción de células alogénicas modificadas genéticamente se describen, por ejemplo, en el documento WO 00/72686A1.

En un enfoque para la preparación de células alogénicas modificadas genéticamente, la secuencia que codifica más de un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y una citocina que es GM-CSF, se introduce en una línea celular que es una línea de células tumorales alogénicas (es decir, obtenida a partir de un individuo distinto del individuo que se está tratando). En otro enfoque, la secuencia que codifica más de un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y una citocina que es GM-CSF, se introduce en líneas de células tumorales alogénicas distintas. Un antígeno tumoral puede ser expresado por la línea celular alogénica antes de la modificación genética y/o un ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral se puede introducir en la línea celular alogénica mediante modificación genética. En general, las células alogénicas proceden de una línea celular tumoral que es del mismo tipo que el tumor o el cáncer que se está tratando, ejemplos de los cuales se han proporcionado más arriba.

En un aspecto de la invención, una población de células tumorales alogénicas se modifica mediante la introducción de uno o varios vectores que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica más de un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o una citocina que es GM-CSF, ligado funcionalmente a un promotor y a secuencias de expresión/control necesarias para la expresión de los mismos. En otro aspecto, una segunda población de células que comprende una población celular tumoral autóloga, con efecto vecindad u alogénica diferente, se modifica mediante la introducción de un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o una citocina que es GM-CSF, ligado funcionalmente a un promotor y secuencias de expresión/control necesarias para la expresión del mismo. La secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o GM-CSF se puede introducir en la misma población celular autóloga, alogénica o con efecto vecindad utilizando el mismo vector o un vector diferente. Deseablemente, las células en la población expresan niveles elevados de una citocina, por ejemplo, GM-CSF.

En la puesta en práctica de la invención, una o varias líneas celulares modificadas genéticamente autólogas, alogénicas o con efecto vecindad, se pueden incubar con la fuente de un antígeno canceroso autólogo, por ejemplo, una célula tumoral autóloga (las cuales juntas comprenden una composición de línea celular alogénica), seguido por la administración al paciente. Típicamente, el antígeno canceroso se proporciona mediante (con) una célula tumoral autóloga del mismo tipo que el cáncer que se está tratando, es decir, una célula cancerosa autóloga. En tales casos, la composición se vuelve incompetente para la proliferación, típicamente mediante radiación, en donde las células modificadas genéticamente y las células cancerosas se extienden en placas de cultivo de tejidos y se irradian a temperatura ambiente usando una fuente de Cs, tal y como se detalla a continuación. La proporción de células

alógenicas frente a células cancerosas autólogas en una administración determinada, variará dependiendo de la combinación.

Se puede utilizar cualquier vía de administración adecuada para introducir una composición de línea celular alógena en el paciente, preferiblemente, la composición se administra por vía subcutánea, intradérmica o intratumoral.

El uso de líneas celulares alógenicas en la puesta en práctica de la presente invención evita la necesidad de cultivar y transducir células tumorales autólogas para cada paciente.

### Efecto vecindad

En un aspecto adicional, la composición celular de la presente invención puede comprender una célula con efecto vecindad inmunomoduladora universal, modificada genéticamente que expresa más de un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y una citocina que es GM-CSF. La misma línea celular con efecto vecindad universal puede expresar más de un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y GM-CSF o un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y GM-CSF se pueden expresar a través de diferentes líneas celulares con efecto vecindad universales. Un antígeno tumoral se puede expresar a través de la línea celular con efecto vecindad antes de la modificación genética, y/o una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno tumoral se puede introducir en las células con efecto vecindad mediante modificación genética. En general, las células con efecto vecindad expresan antígenos tumorales del mismo tipo que el tumor o el cáncer que se está tratando, ejemplos de los cuales se han proporcionado más arriba.

La línea celular universal con efecto vecindad comprende células que carecen de forma natural de antígenos del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y de antígenos del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), o se han modificado de forma que carecen de los antígenos del MHC-I y los antígenos del MHC-II. En un aspecto de la invención, una línea celular universal con efecto vecindad se modifica mediante la introducción de un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica más de uno entre: un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y GM-CSF, ligado funcionalmente a un promotor y a secuencias de expresión/control necesarias para la expresión del mismo. En otro aspecto, una línea celular universal con efecto vecindad se modifica mediante la introducción de un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos uno entre: un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y GM-CSF, ligado funcionalmente a un promotor y secuencias de expresión/control necesarias para la expresión y una línea celular alógena, autóloga o con efecto vecindad universal secundaria, se modifica mediante la introducción de un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o GM-CSF, ligado funcionalmente a un promotor y a secuencias de expresión/control necesarias para la expresión del mismo, a continuación, las dos composiciones de células se utilizan juntas como una vacuna celular. La secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o GM-CSF se puede introducir en la misma población celular autóloga, alógena o con efecto vecindad o en una diferente utilizando el mismo vector o un vector diferente.

Un ejemplo de una línea celular universal preferida con efecto vecindad es K562 (ATCC CCL-243; Lozzio *et al.*, Blood 45(3): 321-334 (1975); Klein *et al.*, Int. J. Cancer 18: 421-431 (1976)). Una descripción detallada de la generación de líneas celulares humanas con efecto vecindad se describe por ejemplo en el documento de patente de EE.UU. n° 6.464.973.

Deseablemente, la línea celular universal con efecto vecindad expresa niveles elevados de la citocina, por ejemplo, GM-CSF.

En la puesta en práctica de la invención, una o varias líneas celulares universales con efecto vecindad se pueden incubar con un antígeno canceroso autólogo, por ejemplo, una célula tumoral autóloga (las cuales juntas comprenden una composición de línea celular universal con efecto vecindad), a continuación la composición de línea celular universal con efecto vecindad se administra al paciente. Cualquier vía de administración adecuada se puede utilizar para introducir una composición de línea celular universal con efecto vecindad, en el paciente. Preferiblemente, la composición se administra por vía subcutánea, intradérmica o intratumoral.

Típicamente, el antígeno canceroso se proporciona a través de (con) una célula del cáncer que se va a tratar, es decir, una célula cancerosa autóloga. En tales casos, la composición se vuelve incompetente para la proliferación mediante radiación, en donde las células con efecto vecindad y las células cancerosas se extienden en placas de cultivo de tejidos y se irradian a temperatura ambiente usando una fuente de Cs, como se ha detallado más arriba.

La relación entre células con efecto vecindad y las células cancerosas autólogas en una administración determinada variará dependiendo de la combinación. Con respecto a las células con efecto vecindad que producen GM-CSF, la relación entre las células con efecto vecindad y las células cancerosas autólogas en una administración dada, debería ser tal que se produce un nivel terapéuticamente eficaz de GM-CSF. Además del umbral de GM-CSF, la relación entre las células con efecto vecindad y las células cancerosas autólogas no debería ser superior a 1:1. Las relaciones apropiadas entre las células con efecto vecindad y las células tumorales o antígenos tumorales se pueden determinar usando métodos de rutina conocidos en la técnica.

El uso de líneas celulares con efecto vecindad en la puesta en práctica de la presente invención evita la necesidad de cultivar y transducir células tumorales autólogas para cada paciente.

**Características generales de las inmunoterapias contra el cáncer de la invención**

5 La inmunoterapia contra el cáncer basada en células de la invención puede comprender una o varias poblaciones celulares diferentes, seleccionadas a partir de células tumorales no modificadas, células tumorales o células no tumorales modificadas para expresar GM-CSF y un anticuerpo anti-CTLA4, células tumorales o células no tumorales modificadas para expresar un anticuerpo anti-CTLA4, células tumorales o células no tumorales modificadas para expresar GM-CSF y similares. Las inmunoterapias contra el cáncer basadas en células de la invención se vuelven incompetentes para la proliferación antes de la administración a un sujeto. Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "incompetente para la proliferación" o "inactivada" se refiere a células que son incapaces de experimentar múltiples rondas de mitosis, pero que todavía conservan la capacidad de expresar proteínas tales como citocinas, antígenos tumorales o proteínas angiogénicas. Esto se puede conseguir a través de numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Antes de la administración a un sujeto, la inmunoterapia contra el cáncer basada en células de la invención se irradia típicamente a una dosis desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 200 rads/min o desde aproximadamente 120 a aproximadamente 140 rads/min antes de la administración al sujeto. Normalmente, cuando se utiliza radiación, los niveles totales necesarios son 2.500 rads, 5000 rads, 10.000 rads, 15.000 rads o 20.000 rads. Preferiblemente, las células se irradian con una dosis total suficiente para inhibir sustancialmente la proliferación en el 100% de las células.

20 La relación entre el número de células modificadas para expresar un anticuerpo anti-CTLA4 y el número de células en un antígeno tumoral o una población celular que expresa citocinas es entre aproximadamente 1:100 a 100:1, de 25:1 a 1:25, 1:10 a 10:1 o 3:1 a 1:3. Las diferentes poblaciones se administran por la misma vía de administración y/o aproximadamente en el mismo sitio y se pueden administrar en el mismo momento o en momentos diferentes. En una realización de la invención, la inmunoterapia comprende una mezcla de células alogénicas procedentes de una pluralidad de donantes/individuos.

25 Las células modificadas genéticamente se pueden administrar una vez, dos veces o varias veces. Para composiciones que comprenden diferentes poblaciones de células, se emplea típicamente entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^9$  células de cada población. En una realización, hay entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  células productoras de citocinas por unidad de dosis. En una realización, hay entre  $1 \times 10^8$  y  $5 \times 10^8$ . Con dosis múltiples, la primera dosis de inmunización puede ser más alta que las dosis de inmunización posteriores. Por ejemplo, una dosis de sensibilización de  $5 \times 10^8$  puede estar seguida por varias dosis de refuerzo de  $1 \times 10^8$  a  $3 \times 10^8$  de células productoras de GM-CSF. En un aspecto de la invención, las células modificadas genéticamente de la inmunoterapia se preparan y se combinan a granel para proporcionar suficientes células para todo el curso del tratamiento previsto. La mezcla se almacena congelada, y se descongelan partes alícuotas en serie para cada administración.

35 En una realización de la invención, la inmunoterapia del cáncer comprende células que expresan al menos 500 ng o al menos 36 ng de GM-CSF durante 24 horas por un millón de células. En una realización, la inmunoterapia del cáncer comprende células que expresan al menos 100 ng de GM-CSF durante 24 horas por un millón de células. Frecuentemente, más importante que el número real de células productoras de citocinas utilizadas, es la capacidad de biosíntesis de las células, por ejemplo, la cantidad de citocina, anticuerpo anti-CTLA4 o antígeno tumoral que se produce a lo largo del tiempo. Por lo tanto, cuando la capacidad biosintética es mayor, se requieren menos células. 40 Las realizaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, una dosis de la inmunoterapia que es capaz de sintetizar al menos aproximadamente 0,1 ng, aproximadamente 0,5 ng, al menos aproximadamente 2 ng o al menos aproximadamente 10 ng de la citocina de interés durante 1 hora de incubación en condiciones fisiológicas. La determinación de la dosificación óptima de células y de las relaciones, es una cuestión de determinación rutinaria, tal y como se describe en la sección de ejemplos a continuación, y está incluida en la experiencia de un experto con experiencia ordinaria, de cara a las instrucciones proporcionadas en el presente documento. 45

Típicamente después del cultivo, las células modificadas genéticamente de la invención se procesan para eliminar la mayoría de los componentes adicionales utilizados en la preparación de las células, antes de su uso como una inmunoterapia del cáncer. En particular, se elimina el suero de ternera fetal, componentes del suero bovino u otros complementos biológicos en el medio de cultivo. En una realización, las células se lavan, tal como mediante centrifugación repetida suave, en un excipiente adecuado farmacológicamente compatible. Los excipientes compatibles incluyen una solución salina isotónica, con o sin un tampón fisiológicamente compatible como fosfato o Hepes y nutrientes tales como dextrosa, iones fisiológicamente compatibles o aminoácidos, y diversos medios de cultivo, en particular los que están desprovistos de otros componentes inmunogénicos. También se pueden utilizar reactivos de transporte, tales como albúmina y fracciones del plasma sanguíneo y agentes espesantes no activos. 50 En una realización, los componentes biológicos no activos, en la medida en que están presentes en la preparación farmacológica, se obtienen a partir de un ser humano, e incluso se pueden obtener previamente a partir del sujeto que se va a tratar. 55

Las composiciones celulares modificadas genéticamente de la invención se pueden utilizar para tratar el cáncer en un sujeto mediante su administración como una o varias inmunoterapias contra el cáncer. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden administrar en combinación con un vehículo farmacéutico 60

aceptable, tal como, por ejemplo, solución salina, sulfato de protamina (Elkins-Sinn, Inc., Cherry Hill, N.J.), agua, tampones acuosos, tales como tampones fosfato y tampones Tris, o polibreno (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), o agentes de localización, tales como gel de calcitonina, soluciones de ácido hialurónico o tapones de fibrina obtenidos a partir de la activación de fibrinógeno a través de trombina (documento de patente de EE.UU. nº 6.117.425). La selección de un vehículo farmacéutico adecuado se considera que será evidente para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas contenidas en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar después, antes, en lugar de o en combinación con otras terapias relacionadas con la generación de una respuesta inmune o el tratamiento del cáncer en el sujeto. Por ejemplo, el sujeto se puede tratar anteriormente o al mismo tiempo mediante quimioterapia, terapia de radiación y otras formas de inmunoterapia, empleando una modalidad de tratamiento utilizada generalmente para tratar el tipo de cáncer que está en tratamiento, utilizando las composiciones celulares de la presente invención. Por ejemplo, las composiciones de la invención se pueden usar en combinación con agentes quimioterapéuticos tales como cisplatino, la combinación de cisplatino/ciclofosfamida, taxol o cisplatino/ciclofosfamida/doxorubicina, agentes inmunomoduladores tales como IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, INF alfa, secuencias CpG, Iniquimod o un anticuerpo anti-CTLA4. Cuando se usan tales modalidades, se emplean en una forma o en un momento en el que no se interfiera con la eficacia de las composiciones de la presente invención.

### Citocinas

La composición celular de la invención comprende al menos una población de células que están modificadas genéticamente para expresar la secuencia que codifica un polipéptido de GM-CSF. La inmunoterapia del cáncer basada en células puede comprender la secuencia que codifica una o varias citocinas. Una "citocina" incluye, sin limitación, aquellas hormonas que actúan a nivel local y no circulan en la sangre y que cuando se utilizan de acuerdo con la presente invención, se produce una alteración de una respuesta inmune de un individuo. Típicamente, la citocina es una citocina humana.

Las citocinas que se pueden expresar a través de la inmunoterapia del cáncer basada en células de la invención incluyen, pero no se limitan a, IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gamma, interleucinas (por ejemplo, IL-1 a IL-29, en particular, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 e IL-18), factores de necrosis tumoral (por ejemplo, TNF-alfa y TNF-beta), eritropoyetina (EPO), MIP3a, ICAM, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). En una realización preferida, la citocina es GM-CSF y la inmunoterapia basada en células es una forma de GVAX®.

### Antígenos tumorales

En una inmunoterapia del cáncer basada en células de la invención, se expresa al menos un antígeno tumoral. El antígeno tumoral se puede expresar a través de la población celular autóloga, alogénica o con efecto vecindad antes de la modificación genética o mediante la expresión de una secuencia codificadora natural procedente de un vector que codifica el antígeno(s) tumoral. Los antígenos tumorales de interés en la puesta en práctica de la invención son antígenos tumorales asociados con el cáncer en tratamiento y contra los que se desea una respuesta inmune mejorada. Dianas de cáncer a modo de ejemplo para el tratamiento que emplea las composiciones y los métodos de la invención, incluyen, pero no se limitan al cáncer de vejiga, de mama, de colon, cáncer de cabeza y cuello, riñón, hígado, pulmón, ovario, cuello uterino, páncreas, recto, próstata, estómago, epidermis; un tumor hematopoyético de estirpe mieloide o linfoide; un tumor de origen mesenquimatoso tal como un fibrosarcoma o rhabdomioma; otros tipos de tumores tales como melanoma, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, adenocarcinoma y carcinoma de pulmón con células no pequeñas. Cuando el tipo de célula tumoral que se está tratando es cáncer de próstata, la línea celular de tumor de próstata se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en DU145, PC-3 y LnCaP.

Secuencias que codifican el antígeno tumoral a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, secuencias inmunogénicas procedentes de MART-1, gp100 (pmel-17), tirosinasa, proteína 1 relacionada con tirosinasa, proteína 2 relacionada con tirosinasa, receptor de la hormona estimulante de melanocitos, MAGE1, MAGE2, MAGE3, MAGE12, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, beta catenina, MUM-1, CDK-4, caspasa 8, KJA 0205, HLA-A2R1701, a-fetoproteína, proteína catalítica de la telomerasa, G-250, MUC-1, proteína carcinoembrionaria (CEA), p53, Her2/neu, isomerasa de triosafosfato, CDC-27, LDLR-FUT, transcriptasa inversa de la telomerasa, mesotelina "surviving", idiotipo Ig de linfoma de linfocitos B, cinasa 4 dependiente de ciclina 4 mutante de melanoma, Pmel-17 (gp100), PSMA, proteína p15 de melanoma, gp75 de melanoma, antígeno oncofetal de melanoma; gangliósidos GM2 y GD2 de melanoma; oncogenes tales como p53 mutante de carcinoma, ras mutante de cáncer de colon y productos víricos tales como proteínas del virus del papiloma humano de cánceres de células escamosas de cuello uterino y esófago.

En una realización, la célula tumoral se obtiene a partir de un mamífero, tal como un ser humano, que alberga un tumor.

### Anticuerpos anti-CTLA4

CTLA4 (CD152) es una molécula inmunomoduladora expresada por linfocitos T que a través de interacciones con moléculas B7 sobre células presentadoras de antígeno (APCs: B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86)), regula negativamente la activación de linfocitos T en diversos sistemas modelo (por ejemplo, véase Korman *et al.* Curr. Opin. Invest. Drugs

6:582-591 (2005)). Ratones con el gen de CTLA4 desactivado muestran una linfoproliferación masiva que conduce a la muerte en menos de 4 semanas. Aunque CTLA4 ha sido ampliamente estudiado, su mecanismo de acción en la reducción de la proliferación de linfocitos T no se entiende completamente. Se cree que los mecanismos incluyen una competición por el ligando B7 en la APC y la interfaz de linfocitos T; eventos de señalización que regulan a la baja IL-2; una inducción de indolamina 2,3-dioxigenasa a través de las APCs; y una inducción de citocinas reguladoras negativas.

Por lo tanto, un anticuerpo anti-CTLA4 puede tener un beneficio terapéutico como monoterapia, pero los niveles sistémicos de anticuerpo anti-CTLA4 necesarios para observar una eficacia en un entorno clínico, son cercanos a la dosis máxima tolerada y se ha informado que tienen una toxicidad relacionada (por ejemplo, véase Korman *et al.* Curr. Opin. Invest. Drugs 6:582-591 (2005)). Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar composiciones que permiten superar las toxicidades potenciales relacionadas, permitiendo un nivel sistémico menor de anticuerpo anti-CTLA4 con una eficacia equivalente.

### Inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas

Los anticuerpos son proteínas inmunoglobulinas que son heterodímeros con una cadena pesada y ligera y han mostrado que son difíciles de expresar en una forma con longitud completa a partir de un único vector en sistemas de expresión en cultivo de mamíferos. Actualmente se utilizan tres métodos para la producción de anticuerpos de vertebrados, la inmunización *in vivo* de animales para producir anticuerpos "policlonales", el cultivo celular *in vitro* de hibridomas de linfocitos B para producir anticuerpos monoclonales (Kohler, *et al.*, Eur. J. Immunol., 6: 511, 1976; Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) y la tecnología de ADN recombinante (que se describe por ejemplo en Cabilly *et al.*, documento de patente de EE.UU. n° 6.331.415).

La estructura molecular básica de polipéptidos de inmunoglobulina es bien conocida e incluye dos cadenas ligeras idénticas con un peso molecular de aproximadamente 23.000 dalton, y dos cadenas pesadas idénticas con un peso molecular 53.000-70.000, en donde las cuatro cadenas se unen mediante enlaces disulfuro en una configuración en "Y". La secuencia de aminoácidos se extiende desde el extremo N-terminal en la parte superior de la Y, hasta el extremo C-terminal en la parte inferior de cada cadena. En el extremo N-terminal hay una región variable (de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud) que proporciona la especificidad de la unión al antígeno.

Los vectores permiten la producción de inmunoglobulinas anti-CTLA4 de todos los tipos, incluyendo, pero no limitados a, anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo que tienen una secuencia natural (es decir, que la secuencia se produce como respuesta a la estimulación con un antígeno), anticuerpos de cadena sencilla que combinan la región variable que se une al antígeno tanto de las cadenas pesadas como ligeras en una sola cadena polipeptídica plegada de forma estable; anticuerpos monovalentes (que comprenden un dímero de cadena pesada/cadena ligera unido a la región Fc de una segunda cadena pesada); "fragmentos Fab", que incluyen la región "Y" completa de la molécula de inmunoglobulina, es decir, los brazos de la "Y", o la cadena ligera o la pesada sola, o porciones de las mismas (es decir, agregados de una cadena pesada y una cadena ligera, comúnmente conocidos como Fab'); "híbridos de inmunoglobulinas" que tienen especificidad hacia dos o más antígenos diferentes (por ejemplo, cuadromas o anticuerpos biespecíficos tal como se describen por ejemplo en el documento de patente de EE.UU. n° 6.623.940); "inmunoglobulinas compuestas" en donde las cadenas pesadas y ligeras imitan las de especies o especificidades diferentes; y "anticuerpos quiméricos", en donde porciones de cada una de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera se obtienen a partir de más de una especie (es decir, la región variable se obtiene a partir de una fuente tal como un anticuerpo murino, mientras que la región constante se obtiene de otro, tal como un anticuerpo humano).

Los vectores tienen utilidad en la producción de inmunoglobulinas anti-CTLA4 o fragmentos de las mismas en donde la cadena pesada o ligera es de "mamífero", "quimérica" o modificada de una manera que mejore su eficacia. Los anticuerpos modificados incluyen variantes de la secuencia tanto de aminoácidos como de nucleótidos que conservan la misma actividad biológica que la forma no modificada y aquellas que están modificadas de tal manera que se altera la actividad, es decir, cambios en la región constante que mejoran la fijación del complemento, la interacción con membranas y otras funciones efectoras, o cambios en la región variable que mejoran las características de unión al antígeno. Las composiciones y los métodos de la invención incluyen además inmunoglobulinas catalíticas o fragmentos de las mismas.

Una secuencia "variante" de polinucleótido que codifica una inmunoglobulina puede codificar una secuencia de aminoácidos "variante" de inmunoglobulina anti-CTLA4 que se altera con uno o varios aminoácidos de la secuencia del polipéptido de referencia. La secuencia de polinucleótidos variante puede codificar una secuencia de aminoácidos variante que contiene sustituciones "conservadoras", en donde el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares al aminoácido al que sustituye. Además o alternativamente, la secuencia de polinucleótidos variante puede codificar una secuencia de aminoácidos variante que contiene sustituciones "no conservadoras", en donde el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas distintas que el aminoácido al que sustituye. Variantes de polinucleótidos que codifican inmunoglobulinas anti-CTLA4 también pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes que contienen inserciones o deleciones de aminoácidos, o ambas. Además, un polinucleótido variante que codifica una inmunoglobulina anti-CTLA4 puede codificar el mismo polipéptido que la secuencia de polinucleótidos de referencia, pero, debido a la degeneración del

código genético, tiene una secuencia de polinucleótidos que se altera en una o varias bases de la secuencia de polinucleótido de referencia.

El término "fragmento", cuando se refiere a una inmunoglobulina anti-CTLA4 recombinante de la invención significa un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es la misma en parte, pero no toda la secuencia de aminoácidos de la proteína inmunoglobulina de longitud completa correspondiente, que o bien conserva esencialmente la misma función o actividad biológica que la proteína de longitud completa correspondiente, o conserva al menos una de las funciones o actividades de la proteína de longitud completa correspondiente. El fragmento incluye preferiblemente al menos 20-100 residuos de aminoácidos contiguos de la inmunoglobulina de longitud completa.

En realizaciones preferidas, se emplea un sistema de expresión de inmunoglobulina que permite la expresión y la administración de dos o más secuencias codificadoras, es decir, inmunoglobulinas con biespecificidades o especificidades múltiples procedentes de un solo vector. El sistema de expresión de la inmunoglobulina es aplicable a cualquier inmunoglobulina anti-CTLA4 (es decir, un anticuerpo) o un fragmento de la misma tal como se detalla adicionalmente en este documento, incluyendo anticuerpos modificados genéticamente, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

El sistema de expresión de una inmunoglobulina se basa en la expresión de las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina anti-CTLA4 utilizando un único promotor regulado, en donde las cadenas pesada y ligera se expresan en proporciones sustancialmente iguales. La unión de las proteínas en forma de poliproteínas es una estrategia adoptada en la replicación de muchos virus, incluyendo los picornaviridae. Después de la traducción, los péptidos con autoprosesamiento codificados por el virus median en la escisión intramolecular rápida (cis) de la poliproteína para producir productos proteicos maduros distintos y la posterior escisión en el sitio de escisión proteolítica elimina la mayoría de la secuencia de autoprosesamiento restante. El sistema de expresión de una inmunoglobulina proporciona ventajas sobre el uso de un IRES porque se proporciona un vector para la expresión de una inmunoglobulina recombinante que comprende un péptido con autoprosesamiento (ejemplificado en este documento por los péptidos 2A) que facilita la expresión de las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina utilizando un único promotor regulado, en donde las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina se expresan en una proporción sustancialmente equimolar. La expresión de las cadenas pesada y ligera de anti-CTLA4 en proporciones sustancialmente equimolares se puede mostrar, por ejemplo, mediante análisis de transferencia Western, en donde las proteínas de la cadena pesada y ligera se separan por SDS-PAGE en condiciones reductoras, se pueden investigar usando un anticuerpo policlonal anti-IgG de rata o anti-IgG humana y se pueden visualizar utilizando kits disponibles comercialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Sitios o secuencias de escisión con autoprosesamiento

Un "sitio de escisión con autoprosesamiento" o una "secuencia de escisión con autoprosesamiento", tal y como se ha definido anteriormente, se refiere a una secuencia de ADN o de aminoácidos en donde después de la traducción tiene lugar una escisión intramolecular rápida (cis) de un polipéptido que comprende el sitio de escisión con autoprosesamiento para producir productos proteicos maduros distintos. Un "sitio de escisión con autoprosesamiento" de este tipo, también se puede denominar un sitio de escisión con procesamiento posterior a la traducción o cotraduccional, ejemplificado en este documento por un sitio, secuencia o dominio 2A. Un sitio, secuencia o dominio 2A muestra un efecto de traducción modificando la actividad del ribosoma para favorecer la hidrólisis de un enlace éster, liberando de este modo el polipéptido del complejo de traducción de una manera que permite que tenga lugar la síntesis de un producto de la traducción aguas abajo, distinto (Donnelly, 2001). Alternativamente, un sitio o un dominio 2A muestra "autoproteólisis" o "escisión" escindiendo su propio extremo C-terminal en cis para producir productos de escisión primarios (Furler; Palmenberg, Ann Rev. Microbiol. 44:603-623 (1990)).

La actividad de 2A puede implicar dar saltos ribosómicos entre codones lo que evita la formación de enlaces peptídicos (de Felipe *et al.*, Human Gene Therapy 11 1921-1931 (2000); Donnelly *et al.*, J. Gen. Virol 82:1013-1025 (2001); aunque se ha considerado que el dominio actúa más como una enzima autolítica (Ryan *et al.*, Virol 173:35-45 (1989)).

Estudios en los que se clonó la región que codifica 2A del Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) en vectores de expresión y se transfectaron en células diana, han establecido que la escisión de 2A de VFA de poliproteínas informadoras artificiales es eficaz en una amplia gama de sistemas de expresión heterólogos (lisado de germen de trigo y planta de tabaco transgénica (Halpin *et al.*, USPN 5.846.767 (1998) y Halpin *et al.*, The Plant Journal 17:453-459 (1999)); la línea celular de glioma humano Hs 683 (de Felipe *et al.*, Gene Therapy 6:198-208 (1999); en lo sucesivo denominada "de Felipe II"); lisado de reticulocitos de conejo y células HTK-143 humanas (Ryan *et al.*, EMBO J. 13:928-933 (1994)); y células de insectos (Roosien *et al.*, J. Gen. Virol 71:1703-1711 (1990)). La escisión mediada con 2A de VFA de una poliproteína heteróloga se ha mostrado para IL-12 (heterodímero p40/p35; Chaplin *et al.*, J. Interferon Citokine Res. 19:235-241 (1999)). En células COS-7 transfectadas, 2A de VFA mediaba en la escisión de una poliproteína p40-2A-p35 en subunidades biológicamente funcionales p40 y p35 que tenían actividades asociadas con IL-12.

La secuencia 2A de VFA se ha incorporado en vectores retrovíricos, sola o combinada con diferentes secuencias IRES para construir vectores bicistrónicos, tricistrónicos y tetracistrónicos. La eficacia de la expresión génica mediada por 2A en animales fue mostrada por Furler (2001) usando vectores de virus adenoasociados recombinantes (VAA) que codificaban a-sinucleína y EGFP o superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD-1) y EGFP unido a través de la secuencia 2A de VFA. EGFP y a-sinucleína se expresaron con niveles sustancialmente más elevados a partir de vectores que incluían una secuencia 2A con respecto a los vectores basados en IRES correspondientes, mientras que SOD-1 se expresó con niveles comparables o ligeramente más elevados. Furler también mostró que la secuencia 2A produce la expresión del gen bicistrónico *in vivo* después de la inyección de vectores de VAA que contenían 2A, en la sustancia negra de ratas. Recientemente se ha mostrado que péptidos 2A y secuencias similares a 2A son eficaces en la traducción eficaz de cuatro cistrones, utilizando un vector retrovírico (Szymczak *et al.*, Nat. Biotechnol. Mayo 2004 22(5): 589-94).

La secuencia de ADN que codifica un sitio de escisión con autoprocésamiento se ejemplifica con secuencias víricas obtenidas a partir de un picornavirus, que incluyen pero no se limitan a enterovirus, rinovirus, cardiovirus, aftovirus o virus de la fiebre aftosa (VFA). En una realización preferida, la secuencia que codifica el sitio de escisión con autoprocésamiento se obtiene a partir de un VFA. Los sitios de escisión con autoprocésamiento incluyen, pero no se limitan a dominios 2A y dominios similares a 2A (Donnelly *et al.*, J. Gen. Virol. 82: 1027-1041 (2001)).

2A de VFA es una región poliproteica que actúa en el genoma del VFA para dirigir una sola escisión en su propio extremo C-terminal, por lo que funciona en cis. Se ha descrito típicamente que el dominio 2A de VFA tiene aproximadamente diecinueve aminoácidos de longitud (LLNFDLLKLAGDVESNPGP; SEQ ID NO: 1); (TLNFDLLKLAGDVESNPGP; SEQ ID NO: 2; Ryan *et al.*, J. Gen. Virol 72:2727-2732 (1991)), sin embargo, se ha observado que oligopéptidos con solo catorce residuos de aminoácidos (LLKLAGDVESNPGP; SEQ ID NO: 3) median en la escisión en el extremo C-terminal de 2A de una manera similar a su función en el procesamiento de las poliproteínas del VFA.

Variaciones de la secuencia 2A han sido estudiadas por su capacidad para mediar en el procesamiento eficaz de poliproteínas (Donnelly ML *et al.* 2001). Los homólogos y las variantes de una secuencia 2A se incluyen dentro del alcance de la invención e incluyen, pero no se limitan a las secuencias presentadas en la Tabla 1, a continuación:

Tabla 1. Tabla de secuencias 2A ejemplares

LLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 1)

TLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 2)

30 LLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 3)

NFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 4)

QLLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 5)

APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 6)

VTELLYRMKRAETYCPRLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 7)

35 LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 8)

EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 9)

El pequeño tamaño de la secuencia que codifica 2A permite además su uso en vectores con una capacidad de empaquetamiento limitado para una secuencia codificadora, tales como VAA. La utilidad de los vectores de VAA se puede ampliar ya que la secuencia 2A elimina la necesidad de promotores duales. El nivel de expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos individuales a partir de un promotor que dirige un marco de lectura abierto único que comprende más de dos secuencias codificadoras junto con 2A están más cerca de ser equimolares en comparación con el nivel de expresión alcanzable usando secuencias IRES o promotores duales. La eliminación de promotores duales también reduce la interferencia con un promotor que puede dar como resultado niveles de expresión reducidos y/o disminuidos para cada secuencia codificante.

45 En una realización preferida, la secuencia 2A de VFA incluida en un vector de acuerdo con la invención, codifica residuos de aminoácidos que comprenden LLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 1). Alternativamente, un vector de acuerdo con la invención puede codificar residuos de aminoácidos de otras regiones similares a 2A, tal y como se describe en Donnelly *et al.*, J. Gen. Virol. 82:1027-1041 (2001) y que incluyen pero no se limitan a un dominio similar a 2A de picornavirus, virus de insecto, rotavirus de tipo C, secuencias repetidas de tripanosoma o la bacteria, *Thermatoga* marítima.

50

#### **Eliminación de secuencias peptídicas con autoprocésamiento**

Una problema asociado con el uso de péptidos con autoprocésamiento, tales como 2A o secuencias similares a 2A

es que el extremo N-terminal de la primera cadena del anticuerpo anti-CTLA4 contiene aminoácidos obtenidos a partir del péptido con autoprocesamiento, es decir, residuos de aminoácidos obtenidos a partir de 2A. Estos residuos de aminoácidos son "ajenos" al hospedador y pueden provocar una respuesta inmune cuando la proteína recombinante se expresa o se administra *in vivo* (es decir, expresada a partir de un vector vírico o no vírico en el contexto de una terapia génica, o administrada como proteína recombinante producida *in vitro*). Además, si no se eliminan, los residuos de aminoácidos obtenidos a partir de 2A pueden interferir con la secreción de proteínas en las células tumorales que expresan citocinas y/o alterar la conformación proteica, lo que da como resultado un nivel de expresión menor que la expresión óptima y/o una reducción de la actividad biológica del anticuerpo anti-CTLA4. El sistema de expresión de inmunoglobulinas incluye estructuras artificiales de expresión de genes, modificadas genéticamente de tal manera que se proporciona un sitio de escisión proteolítica entre una secuencia que codifica el polipéptido y el sitio de escisión con autoprocesamiento (es decir, una secuencia 2A) como un medio para eliminar un sitio restante de escisión con autoprocesamiento obtenido a partir de residuos de aminoácidos después de la escisión.

Ejemplos de sitios de escisión proteolítica son sitios de escisión de furina con la secuencia de consenso RXK(R)R (SEQ ID NO: 10), que se pueden escindir con proteasas endógenas similares a subtilisina, tales como furina y otra proteasas de serina dentro de la ruta de secreción proteica. Como se muestra en el documento USSN 10/831302, los residuos de 2A en el extremo N-terminal de la primera proteína se pueden eliminar de manera eficaz mediante la introducción de un sitio de escisión de furina RAKR (SEQ ID NO: 15) entre la primera proteína y la secuencia 2A. Además, se mostró que el uso de un plásmido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia 2A y un sitio de escisión de furina adyacente al sitio de 2A, producía un mayor nivel de expresión proteica que un plásmido que contenía la secuencia 2A sola. Esta mejora proporciona una ventaja adicional ya que cuando los residuos 2A se eliminan del extremo N-terminal de la proteína, se pueden utilizar secuencias 2A o similares a 2A u otras secuencias con autoprocesamiento más largos. Tales secuencias más largas con autoprocesamiento como las secuencias 2A o similares a 2A pueden facilitar una expresión equimolar mejor de dos o más polipéptidos a través de un único promotor.

Es ventajoso emplear anticuerpos anti-CTLA4 o análogos de los mismos con características totalmente humanas. Estos reactivos evitan las respuestas inmunes no deseadas inducidas por anticuerpos o análogos procedentes de especies no humanas. Para hacer frente a posibles respuestas inmunes del hospedador frente a residuos de aminoácidos obtenidos a partir de péptidos con autoprocesamiento, la secuencia que codifica un sitio de escisión proteolítica se puede insertar (usando metodología convencional conocida en la técnica) entre la secuencia que codifica la primera proteína y la secuencia que codifica el péptido con autoprocesamiento, a fin de eliminar la secuencia del péptido con autoprocesamiento del polipéptido expresado, es decir, el anticuerpo. Esto tiene una utilidad particular en anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico para uso *in vivo*.

Cualquier sitio de escisión proteolítico adicional conocido en la técnica que se puede expresar usando vectores con tecnología de ADN recombinante, se puede emplear en la puesta en práctica de la invención. Ejemplos de sitios de escisión proteolíticos adicionales que se pueden insertar entre la cadena pesada o ligera del anticuerpo anti-CTLA4 y una secuencia de escisión con autoprocesamiento (tal como una secuencia 2A) incluyen, pero no se limitan a un:

- a). Sitio de escisión de furina: RXK(R)R (SEQ ID NO: 10);
- b). Sitio de escisión de Factor Xa: IE(D)GR (SEQ ID NO: 12);
- c). Sitio de escisión de peptidasa I señal: p. ej., LAGFATVAQA (SEQ ID NO: 13); y
- d). Sitio de escisión de trombina LVPRGS (SEQ ID NO: 14).

La secuencia del péptido 2A ofrece un lado de "escisión" que facilita la generación de ambas cadenas de una inmunoglobulina anti-CTLA4 durante el proceso de traducción. En un aspecto, el extremo C-terminal de la cadena pesada de la inmunoglobulina anti-CTLA4 contiene aproximadamente 13 residuos de aminoácidos que se obtienen a partir de la misma secuencia 2A. El número de aminoácidos residuales depende de la secuencia 2A utilizada. Cuando se inserta una secuencia del sitio de escisión de furina, por ejemplo, RAKR, entre la primera proteína y la secuencia 2A, los residuos 2A se eliminan del extremo C-terminal de la primera proteína. Sin embargo, los datos de espectros de masas indican que el extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo expresado a partir de la estructura artificial RAKR-2A contiene dos residuos de aminoácidos adicionales, RA, procedentes del sitio de escisión de furina, RAKR.

Estos aminoácidos residuales se pueden eliminar utilizando, por ejemplo, carboxipeptidasa. La escisión de furina se produce en el extremo C-terminal del sitio de escisión, que tiene la secuencia de consenso RXR(K)R (SEQ ID NO: 16), en donde X es cualquier aminoácido. En un aspecto, la invención proporciona un medio para la eliminación de los residuos de aminoácidos básicos recién expuestos R o K, del extremo C-terminal de la proteína, mediante el uso de una enzima seleccionada a partir de un grupo de enzimas llamadas carboxipeptidasas (CPs), que incluyen la carboxipeptidasa D, E y H (CPD, CPE, CPH). Ya que las CPs son capaces de eliminar residuos de aminoácidos básicos en el extremo C-terminal de una proteína, todos los residuos de aminoácidos obtenidos a partir de un sitio de escisión de furina que contienen exclusivamente aminoácidos básicos R o K, tales como RKKR (SEQ ID NO: 17),

RKRR (SEQ ID NO: 18), RRKR (SEQ ID NO: 19), RRRR (SEQ ID NO: 20), etc., se pueden eliminar con una CP. Estructuras artificiales para la expresión de inmunoglobulina anti-CTLA4 que contienen una secuencia 2A y un sitio de escisión de furina y que tienen residuos de aminoácidos básicos en el extremo C-terminal, se pueden construir para evaluar la eficacia de la escisión y la eliminación de residuos. Un diseño de estructura artificial ejemplar es el siguiente: cadena H - furina (por ejemplo, RKKR, RKRR, RRKR o RRRR) - 2A - cadena L o cadena L - furina (por ejemplo, RKKR, RKRR, RRKR o RRRR) - 2A - cadena H.

Como será evidente para los expertos en la técnica, hay un residuo de aminoácido básico (K) en el extremo C-terminal de la cadena pesada (H) de la inmunoglobulina (que se vuelve el objetivo de una escisión con carboxipeptidasa), mientras que la cadena ligera de inmunoglobulina (L), termina con un aminoácido no básico C.

## 10 Variantes de secuencia

En una realización de la invención, las secuencias de nucleótidos que codifican un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o una citocina es la secuencia natural de la proteína natural, un fragmento biológicamente activo o inmunogénico de la misma. Además, la secuencia codificadora se puede "recodificar". Un gen que está "recodificado" se refiere a una secuencia codificadora que se altera de tal manera que el polipéptido codificado por un ácido nucleico sigue siendo el mismo que en la secuencia inalterada, pero la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido cambia. Es bien conocido en la técnica que debido a la degeneración del código genético, existen múltiples codones de ADN y ARN que pueden codificar el mismo producto en la traducción de aminoácidos. Además, también se sabe que diferentes organismos tienen diferentes preferencias para el uso de codones particulares para sintetizar un aminoácido.

También se incluyen dentro del alcance de la invención células modificadas genéticamente que comprenden variantes de secuencias que codifican una forma biológicamente activa o inmunogénica de un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o una citocina.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "identidad de secuencia" significa una identidad de la secuencia del ácido nucleico o de los aminoácidos en dos o más secuencias alineadas, cuando se alinean utilizando un programa de alineación de secuencias. La expresión "% de homología" se usa en esta memoria de forma intercambiable con la expresión "% de identidad" en el presente documento y se refiere al nivel de identidad de secuencia en el ácido nucleico o los aminoácidos entre dos o más secuencias alineadas, cuando se alinean utilizando un programa de alineación de secuencias. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento, 80% de homología significa lo mismo que 80% de identidad de secuencia, determinada mediante un algoritmo definido, y por ello un homólogo de una secuencia dada tiene más de 80% de identidad de secuencia a lo largo de la secuencia dada.

Una alineación óptima de las secuencias para una comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de programas informáticos de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), mediante el algoritmo BLAST, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990), con un programa informático que está disponible públicamente a través del Centro Nacional para Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), o mediante inspección visual (véase en general, Ausubel *et al.*, *infra*). Para los fines de la presente invención, una alineación óptima de secuencias para comparación se lleva a cabo más preferiblemente con el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981). Véase, también, Altschul, S.F. *et al.*, 1990 y Altschul, S.F. *et al.*, 1997.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o proteínas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para tener una correspondencia máxima, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descrito en el presente documento, por ejemplo, el algoritmo de Smith-Waterman o por inspección visual.

De acuerdo con la presente invención, también se incluyen variantes de secuencias que codifican un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o una citocina que tienen un 80, 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o más de identidad de secuencia con la secuencia natural.

Una secuencia de ácido nucleico se considera que se puede "hibridar selectivamente" con una secuencia de ácido nucleico de referencia, si las dos secuencias se hibridan específicamente entre sí en condiciones de hibridación y de lavado desde moderadas hasta muy rigurosas. Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del complejo de unión del ácido nucleico o de la sonda. Por ejemplo, "rigurosidad máxima" por lo general se produce a aproximadamente una  $T_m$   $-5^\circ\text{C}$  ( $5^\circ$  por debajo de la  $T_m$  de la sonda); "rigurosidad alta" a aproximadamente  $5-10^\circ$  por debajo de la  $T_m$ ; "rigurosidad intermedia" a aproximadamente  $10-20^\circ$  por debajo de la  $T_m$  de la sonda; y "rigurosidad baja" a aproximadamente  $20$  a  $25^\circ$  por debajo de la  $T_m$ . Funcionalmente, las condiciones con una rigurosidad máxima se pueden utilizar para identificar secuencias que tienen una identidad

exacta o una identidad casi exacta con la sonda de hibridación; mientras que las condiciones de rigurosidad alta se utilizan para identificar secuencias que tienen aproximadamente 80% o más de identidad de secuencia con la sonda.

Las condiciones de hibridación con rigurosidad moderada y alta son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, 1989, Capítulos 9 y 11, y en Ausubel, F.M., *et al.*, 1993). Un ejemplo de condiciones de rigurosidad alta incluye la hibridación a aproximadamente 42°C en 50% de formamida, 5X SSC, 5X solución de Denhardt, 0,5% de SDS y 100 µg/ml de ADN vehículo desnaturalizado, seguido por un lavado dos veces con 2X SSC y 0,5% SDS a temperatura ambiente y dos veces adicionales con 0,1 X SSC y 0,5% de SDS a 42°C. Tal y como se emplea en el presente documento, las secuencias de nucleótidos que codifican un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o una citocina que incluyen variantes de secuencias que codifican un polipéptido con la misma actividad biológica que el antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o polipéptidos de citocina descritos en el presente documento y que se hibridan en condiciones de hibridación con rigurosidad de moderada a alta, se consideran dentro del alcance de la presente invención.

Como resultado de la degeneración del código genético, se puede producir una serie de secuencias que codifican el mismo antígeno tumoral, anticuerpo anti-CTLA4 o polipéptido de citocina. Por ejemplo, el triplete CGT codifica el aminoácido arginina. La arginina se codifica alternativamente con CGA, CGC, CGG, AGA y AGG. Por lo tanto se aprecia que tales sustituciones en la región codificadora entran dentro de las variantes de secuencia que están incluidas en la presente invención.

Se aprecia, además, que tales variantes de la secuencia se pueden hibridar o no con la secuencia progenitora en condiciones de rigurosidad alta. Esto sería posible, por ejemplo, cuando la variante de la secuencia incluye un codón diferente para cada uno de los aminoácidos codificados por los nucleótidos progenitores. Aun así tales variantes se contemplan específicamente y están incluidas en la presente invención.

#### **Introducción de transgenes en una célula**

La secuencia que codifica un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o una citocina se puede introducir en una célula usando cualquier método eficaz para dar como resultado la expresión en la célula. Típicamente, vectores que comprenden una secuencia codificadora de interés se preparan usando técnicas de biología molecular conocidas, empleadas rutinariamente por los expertos en la técnica.

La presente invención contempla el uso de cualquier vector disponible para introducir en las células la secuencia que codifica un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o una citocina. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores víricos y no víricos.

Se pueden emplear partículas de vectores víricos con el fin de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos en células *in vitro* o *in vivo*. Numerosas formas de vectores víricos y no víricos son conocidas en la técnica. Ejemplos de vectores que se pueden utilizar para la puesta en práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, los derivados de MoMLV, MSCV, SFFV, MPSV, SNV, etc.), incluyendo lentivirus (por ejemplo, procedentes de VIH-1, VIH-2, VIS, BIV, VIF, etc.), vectores del virus vaccinia, vectores del virus herpes (por ejemplo, HSV), vectores de baculovirus, vectores de citomegalovirus (CMV), vectores del virus del papiloma, vectores del virus de simio (SV40), vectores de Sindbis, vectores del virus del sarcoma de Rous, vectores del virus del bosque Semliki, vectores de fagos, vectores del virus Epstein Barr, vectores del virus herpes, vectores de adenovirus (Ad), vectores que incluyen una replicación competente, una replicación deficiente y formas sin determinar de los mismos, vectores de baculovirus, vectores de virus adenoasociado (VAA) y vectores de plásmidos no víricos.

Los vectores y las estructuras artificiales para la expresión de un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o una citocina se pueden introducir en las células utilizando una metodología convencional. Los métodos de transfección, transducción o infección son bien conocidos por los expertos en la técnica. El término "transducción" se refiere a la administración de una molécula de ácido nucleico en una célula receptora *in vivo* o *in vitro* a través de una infección, internalización, transfección o cualquier otro medio. La transfección se puede llevar a cabo a través de una variedad de medios conocidos en la técnica, incluyendo la coprecipitación de ADN con fosfato de calcio, la transfección mediada con DEAE-dextrano, la transfección mediada con polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biolística, véase Graham *et al.* (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis *et al.* (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, y Chu *et al.* *Gene* 13:197, 1981. Tales técnicas se pueden usar para introducir uno o varios restos de ADN exógeno, tal como un vector plasmídico y otras moléculas de ácido nucleico, en células hospedadora adecuadas. El término se refiere a la captación tanto estable como temporal del material genético.

Los vectores utilizados en la puesta en práctica de la invención pueden codificar opcionalmente un marcador seleccionable, tal como neo, DHFR, sintetasa de Gln o ADA, seguido de una selección en presencia del fármaco adecuado y el aislamiento de clones. Se puede utilizar más de un vector para introducir las secuencias codificadoras de un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 en una célula. La invención no se limita a ningún orden secuencial para la transducción. En otras palabras, para transducir las células se puede utilizar más de un vector esencialmente de forma simultánea o secuencial en cualquier orden.

En el caso en el que se introduzca más de una secuencia que codifica un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 o una citocina en un célula, usando un único vector, las secuencias codificadoras pueden estar bajo el control de promotores distintos o pueden estar ligadas funcionalmente al mismo promotor y bajo el control traduccional de un IRES, una secuencia 2A o una secuencia similar a 2A, tal como se describe en los documentos US04/12793 y US04/12807.

### 5 Vectores de VAA

El virus adenoasociado (VAA) es un parvovirus humano dependiente de un auxiliar. Los vectores de VAA tienen un importante potencial como vectores de transferencia génica debido a su naturaleza no patógena, el excelente perfil de seguridad clínica y la capacidad para dirigir cantidades significativas de expresión del transgen *in vivo*. Los vectores de VAA recombinantes se caracterizan por que son capaces de dirigir la expresión y la producción de los productos transgénicos seleccionados en las células diana. Por lo tanto, los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias de VAA esenciales para la encapsidación y las estructuras físicas para la infección de células diana. La infección de una célula con un vector vírico de VAA incorporado en una partícula vírica, lleva típicamente a la integración del vector vírico en el genoma de la célula hospedadora. Por lo tanto, los vectores de VAA proporcionan el potencial para una expresión a largo plazo desde la célula, y las "células hijas" que son el resultado de la división celular.

Los viriones de VAA recombinantes (VAAR) para uso en la puesta en práctica de la presente invención se pueden producir usando metodología convencional, conocida por los expertos en la técnica y se construyen de tal manera que incluyen, como componentes ligados funcionalmente en la dirección de la transcripción, secuencias de control, que incluyen secuencias de iniciación y terminación de la transcripción, y la secuencia que codifica un transgén. Estos componentes están delimitados en el extremo 5' y 3' por secuencias ITR de VAA funcionales. Por "secuencias ITR de VAA funcionales" se entiende que las secuencias ITR actúan como se pretende para el rescate, replicación y empaquetamiento del virión de VAA. Por lo tanto, las ITRs de VAA para uso en los vectores de la invención no necesitan tener una secuencia de nucleótidos de tipo silvestre, y se pueden alterar por la inserción, delección o sustitución de nucleótidos o las ITRs de VAA se pueden obtener a partir de cualquiera de los diversos serotipos de VAA. Un vector de VAA es un vector obtenido a partir de un serotipo de virus adenoasociado, incluyendo sin limitación, VAA 1, VAA 2, VAA 3, VAA 4, VAA 5, VAA 6, VAA 7, VAA 8, etc. En algunas realizaciones, en los vectores de VAA se eliminan los genes REP y CAP de tipo silvestre en su totalidad o en parte, pero conservan las secuencias ITR flanqueantes y funcionales.

Típicamente, un vector de expresión de VAA se introduce en una célula productora, seguido de la introducción de una estructura artificial auxiliar de VAA, en donde la estructura artificial auxiliar incluye regiones que codifican VAA que pueden ser expresadas en la célula productora, y que complementan funciones auxiliares de VAA ausentes en el vector de VAA. La estructura artificial auxiliar se puede diseñar para regular a la baja la expresión de las proteínas REP grandes (Rep78 y Rep68), típicamente por mutación del codón de iniciación después de p5 desde ATG a ACG, tal y como se describe en el documento de patente de EE.UU. n° 6548286. Esto va seguido de la introducción de un virus auxiliar y/o vectores adicionales en la célula productora, en donde el virus auxiliar y/o los vectores adicionales proporcionan funciones accesorias capaces de sostener la producción eficaz de virus VAAR. Las células productoras se cultivan a continuación para producir VAAR. Estas etapas se llevan a cabo utilizando una metodología convencional. Viriones de VAA con una replicación defectuosa que encapsulan los vectores de VAA recombinantes de la presente invención, se preparan por métodos convencionales conocidos en la técnica, usando células empaquetadoras de VAA y tecnología de empaquetamiento. Ejemplos de estos métodos se pueden encontrar, por ejemplo, en el documento de patente de EE.UU. n° 5.436.146; 5.753.500, 6.040.183, 6.093.570 y 6.548.286. Otras composiciones y métodos para el empaquetamiento se describen en Wang *et al.* (documento de EE.UU. 2002/0168342) e incluyen los métodos que son conocidos por los expertos en la técnica.

Se conocen en la actualidad aproximadamente 40 serotipos de VAA, sin embargo, hoy en día están siendo identificados todavía nuevos serotipos y variantes de serotipos existentes y se consideran dentro del alcance de la presente invención. Véase Gao *et al.* (2002), PNAS 99(18):11854 6; Gao *et al.* (2003), PNAS 100(10):6081 6; Bossis y Chiorini (2003), J. Virol. 77(12):6799 810). Diferentes serotipos de VAA se utilizan para mejorar la transducción de células diana particulares o para dirigirse a tipos celulares específicos dentro de un tejido diana particular. Serotipos de VAA particulares se pueden dirigir de manera más eficaz y/o replicar en tejido o células diana. Un vector de VAA autocomplementario aislado se puede utilizar en la puesta en práctica de la invención, con el fin de aumentar la eficacia de la transducción y dar como resultado un inicio más rápido de la expresión transgénica (McCarty *et al.*, Gene Ther Ago 2001; 8(16): 1248 54).

Células hospedadoras adecuadas para producir viriones de VAAR incluyen células de mamífero, células de insecto, microorganismos y levaduras. Las células hospedadoras también pueden ser células de empaquetamiento en donde los genes de VAA REP y CAP se mantienen de manera estable en la célula hospedadora o, alternativamente, células hospedadoras pueden ser células productoras en las que el genoma del vector VAA se mantiene de forma estable. Células de empaquetamiento y productoras a modo de ejemplo se obtienen a partir de células A549, 293 o HeLa. Los vectores de VAA se purifican y se formulan utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica.

### 60 Vectores retrovíricos

Los vectores retrovéricos son una herramienta común para la administración de genes (Miller, 1992, Nature 357: 455-460). Los vectores retrovéricos que incluyen vectores lentivéricos se pueden usar en la puesta en práctica de la presente invención. Los vectores retrovéricos se han sometido a ensayo y han mostrado ser vehículos de administración adecuados para la introducción estable de una variedad de genes de interés en el ADN genómico de una amplia gama de células diana. La capacidad de los vectores retrovéricos para entregar un transgén(es) dentro de las células hace que los vectores retrovéricos sean muy adecuados para la transferencia de genes a las células. Además, los retrovirus entran en las células hospedadoras mediante la unión de glicoproteínas de la envuelta retrovérica a receptores específicos de la superficie celular, en las células hospedadoras. En consecuencia, los vectores retrovéricos seudotipificados en los que la proteína natural de la envuelta codificada se reemplaza por una proteína heteróloga de la envuelta que tiene una especificidad celular diferente de la de la proteína de la envuelta natural (por ejemplo, se une a un receptor diferente de la superficie celular, en comparación con la proteína de la envuelta natural) también pueden tener una utilidad en la puesta en práctica de la presente invención.

La presente invención proporciona vectores retrovéricos que incluyen, por ejemplo, vectores retrovéricos de transferencia que comprenden una o varias secuencias transgénicas y vectores de empaquetamiento retrovéricos que comprenden uno o varios elementos de empaquetamiento. En particular, la presente invención proporciona vectores retrovéricos seudotipificados que codifican una proteína de la envuelta heteróloga o modificada funcionalmente para la producción de retrovirus seudotipificados.

La secuencia central de los vectores retrovéricos de la presente invención se puede obtener fácilmente a partir de una amplia variedad de retrovirus, incluyendo, por ejemplo, los retrovirus de tipo B, C y D, así como espumavirus y lentivirus (véase ARN Tumor Viruses, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985). Un ejemplo de un retrovirus adecuado para uso en las composiciones y métodos de la presente invención incluye, pero no se limita al lentivirus. Otros retrovirus adecuados para uso en las composiciones y métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan al virus de la leucosis aviar, virus de la leucemia bovina, virus de la leucemia murina, virus inductores de focos en células de visión, virus del sarcoma murino, virus de la reticuloendoteliosis y virus del sarcoma de Rous. Particularmente preferidos son los virus de la leucemia murina que incluyen 4070A y 1504A (Hartley y Rowe, J. Virol. 19:1925, 1976), Abelson (ATCC nº VR 999), Friend (ATCC nº VR 245), Graffi, Gross (ATCC nº VR 590), Kirsten, virus del sarcoma de Harvey y Rauscher (ATCC nº VR 998), y virus de la leucemia murina de Moloney (ATCC nº VR 190). Tales retrovirus se pueden obtener fácilmente a partir de depósitos o colecciones tales como la "American Type Culture Collection" ("ATCC"; Rockville, Md), o se pueden aislar a partir de fuentes conocidas usando técnicas disponibles en general.

Preferiblemente, una secuencia del vector retrovérico de la presente invención se obtiene a partir de un lentivirus. Un lentivirus preferido es un virus de la inmunodeficiencia humana, por ejemplo, de tipo 1 o 2 (es decir, VIH 1 o VIH 2, en donde el VIH 1 se llamaba antes virus asociado con linfadenopatía 3 (HTLV 111) y virus relacionado (ARV) con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)), u otro virus relacionado con VIH 1 o VIH 2 que se ha identificado y asociado con el SIDA o una enfermedad similar al SIDA. Otros vectores de lentivirus que se pueden utilizar en la puesta en práctica de la invención incluyen, el virus Visna/maedi de oveja, un virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), un lentivirus bovino (por ejemplo, BIV; documento WO200366810), un virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), un virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) y un virus de la artritis encefalitis caprina (CAEV).

Diversos géneros y cepas de retrovirus adecuados para uso en las composiciones y los métodos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Fields Virology, Tercera Edición, editado por B.N. Fields *et al.*, Lippincott Raven Publishers (1996), véase, por ejemplo, el capítulo 58, Retroviridae: The Viruses and Their Replication, Classification, páginas 1768-1771, incluyendo la Tabla 1)

Se conocen los sistemas de empaquetamiento retrovérico para la generación de células productoras y líneas celulares productoras que producen retrovirus, y los métodos para preparar tales sistemas de empaquetamiento. Los sistemas de empaquetamiento retrovérico para uso en la generación de líneas celulares comprenden al menos dos vectores de empaquetamiento: un primer vector de empaquetamiento que comprende una primera secuencia de nucleótidos que comprende los genes gag, pol, o gag y pol; y un segundo vector de empaquetamiento que comprende una segunda secuencia de nucleótidos que comprende un gen de la envuelta heterólogo o modificado funcionalmente. En una realización, los elementos retrovéricos se obtienen a partir de un lentivirus, tal como VIH. Preferiblemente, los vectores carecen de un gen tat funcional y/o de genes accesorios funcionales (vif, vpr, vpu, vpx, nef). En otra realización, el sistema comprende además un tercer vector de empaquetamiento que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende un gen rev. El sistema de empaquetamiento se puede proporcionar en forma de una célula de empaquetamiento que contiene la primera secuencia, la segunda secuencia y, opcionalmente, la tercera secuencia de nucleótidos.

Son aplicables una variedad de sistemas retrovéricos, y los expertos en la técnica apreciarán los elementos comunes compartidos a través diferentes grupos de retrovirus. La descripción de este documento utiliza sistemas lentivéricos como un ejemplo representativo. Sin embargo, todos los retrovirus comparten las características de viriones con envuelta con proyecciones en la superficie y que contienen una molécula de ARN lineal, de sentido positivo, monocatenaria, un genoma que consiste en un dímero y las proteínas comunes gag, pol y env.

En una realización, los sistemas de empaquetamiento del vector lentivérico proporcionan estructuras artificiales de

empaquetamiento distintas para gag/pol y env, y por lo general emplean una proteína de la envuelta heteróloga o funcionalmente modificada (por ejemplo, la envuelta de VSVG). En una realización adicional, los sistemas de vectores lentivíricos tienen los genes accesorios, vif, vpr, vpu y nef, eliminados o inactivados. En una realización adicional, los sistemas de vectores lentivíricos tienen el gen tat deletado o inactivado de otro modo (por ejemplo, a través de una mutación). En otra realización, la secuencia que codifica gag y pol se "divide" en dos secuencias codificadoras diferentes o marcos de lectura abiertos, tal y como se conoce en la técnica. Típicamente las secuencias que codifican la división de gag y pol, están ligadas funcionalmente a promotores heterólogos distintos y pueden estar situadas en moléculas de ácido nucleico diferentes.

La compensación de la regulación de la transcripción proporcionada normalmente por tat se puede proporcionar mediante el uso de un promotor constitutivo fuerte, tal como el potenciador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (IE de HCMV). Otros promotores/potenciadores se pueden seleccionar basándose en la potencia de la actividad del promotor constitutivo, la especificidad hacia el tejido diana (por ejemplo, un promotor específico de hígado), u otros factores relacionados con el control deseado de la expresión, tal y como se entiende en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, es deseable emplear un promotor inducible tal como tet, para conseguir una expresión controlada. El gen que codifica rev se proporciona preferiblemente en una estructura artificial de expresión distinta, de tal manera que el sistema del vector lentivírico implicará cuatro estructuras artificiales (por ejemplo, plásmidos): una para cada uno de gag/pol, rev, envuelta y el vector de transferencia. Independientemente de la generación del sistema de empaquetamiento empleado, gag y pol se pueden proporcionar en una única estructura artificial o en estructuras artificiales distintas.

Por lo general, los vectores de empaquetamiento se incluyen en una célula de empaquetamiento, y se introducen en una célula mediante transfección, transducción o infección. Los métodos para la transfección, transducción o infección son bien conocidos por los expertos en la técnica. Un vector de transferencia retrovírico de la presente invención se puede introducir en una línea celular de empaquetamiento, mediante transfección, transducción o infección, para generar una célula o una línea celular productora. Los vectores de empaquetamiento de la presente invención se pueden introducir en células o en líneas celulares humanas por métodos convencionales, que incluyen, por ejemplo, la transfección con fosfato de calcio, lipofección o electroporación. En algunas realizaciones, los vectores de empaquetamiento se introducen en las células junto con un marcador seleccionable dominante, tal como neo, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido de la selección en presencia del fármaco adecuado y el aislamiento de clones. Un gen marcador seleccionable puede estar ligado físicamente a genes codificados por el vector de empaquetamiento o se puede introducir conjuntamente (por ejemplo, cotransfectado) con el vector de empaquetamiento.

Las líneas celulares estables, en las que las funciones de empaquetamiento están configurados para ser expresadas a través de una célula de empaquetamiento adecuada, son conocidas. Por ejemplo, véase el documento de patente de EE.UU. n° 5.686.279; y Ory *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (1996) 93:11400 11406, que describen células de empaquetamiento. Una descripción más detallada de la producción de una línea celular estable se puede encontrar en Dull *et al.*, 1998, J. Virology 72(11): 8463 8471; y en Zufferey *et al.*, 1998, J. Virology 72 (12):9873 9880.

Los vectores de empaquetamiento de interés pueden contener cambios adicionales en las funciones de empaquetamiento para mejorar la expresión de proteínas de lentivirus y para mejorar la seguridad. Por ejemplo, todas las secuencias de VIH aguas arriba de gag se pueden eliminar. Además, las secuencias aguas abajo de la envuelta se pueden eliminar. Por otra parte, se pueden tomar medidas para modificar el vector para mejorar el corte y empalme y la traducción del ARN.

Opcionalmente, se utiliza un sistema de empaquetamiento condicional, tal como el descrito por Dull *et al.*, 1998, J. Virology 72(11):8463 8471. También se prefiere el uso de un vector que se autoinactiva (SIN), que mejora la bioseguridad del vector gracias a la eliminación de la repetición terminal larga (LTR) de VIH 1 como se describe, por ejemplo, en Zufferey *et al.*, 1998, J. Virology 72(12):9873 9880. También se pueden utilizar vectores inducibles, tales como a través de una LTR inducible con tet.

### **Vectores adenovíricos**

Los vectores adenovíricos tal como se describen en este documento se pueden utilizar para expresar antígenos tumorales, GM-CSF, un anticuerpo anti-CTLA4 o cualquier combinación de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "adenovirus" y "partícula adenovírica" se utilizan para referirse a cualquiera y a todos los virus que se pueden catalogar como adenovirus, incluyendo cualquier adenovirus que infecta a un ser humano o a un animal, incluyendo todos los grupos, subgrupos y serotipos. Por lo tanto, tal y como se usa en esta memoria, "adenovirus" y "partícula de adenovirus" se refiere al propio virus o a derivados del mismo e incluye todos los serotipos y subtipos y las formas de origen natural y recombinantes, excepto cuando se indique lo contrario. Tales adenovirus pueden ser de tipo silvestre o se pueden modificar de varias maneras conocidas en la técnica o tal y como se describe en esta memoria. Tales modificaciones incluyen modificaciones en el genoma del adenovirus que se empaqueta en la partícula con el fin de que un virus sea infeccioso. Tales modificaciones incluyen deleciones conocidas en la técnica, tales como deleciones en una o varias de las regiones codificadoras de E1a, E1b, E2a, E2b, E3 o E4. Las expresiones también incluyen adenovirus específicos de la

replicación; es decir, virus que se replican preferentemente en ciertos tipos de células o tejidos, pero en un grado menor o en absoluto en otros tipos. Tales virus se denominan a veces virus (o vectores) "citopáticos" o "citofíticos", y, si tienen un efecto de este tipo sobre las células neoplásicas, se conocen como virus (o vectores) "oncolíticos".

5 La presente invención contempla el uso de cualquiera y de todos los serotipos adenovíricos para construir vectores adenovíricos y partículas víricas de acuerdo con la presente invención. Las existencias adenovíricas que se pueden emplear de acuerdo con la invención incluyen cualquier serotipo de adenovirus. Los serotipos de adenovirus 1 a 51 están actualmente disponibles en la "American Type Culture Collection" (ATCC, Manassas, VA), y la invención incluye cualquier otro serotipo de adenovirus disponible procedente de cualquier fuente. Los adenovirus que se pueden emplear según la invención pueden ser de origen humano o no humano, tal como bovino, porcino, canino, 10 símico, aviar. Por ejemplo, un adenovirus puede ser del subgrupo A (por ejemplo, los serotipos 12, 18, 31), el subgrupo B (por ejemplo, los serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50), el subgrupo C (por ejemplo, los serotipos 1, 2, 5, 6), el subgrupo D (por ejemplo, los serotipos 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47, 49, 51), el subgrupo E (serotipo 4), el subgrupo F (serotipo 40, 41) o cualquier otro serotipo adenovírico. Numerosos ejemplos de adenovirus humanos y animales están disponibles en la American Type Culture Collection, que se encuentra, por 15 ejemplo, en <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/CellBiology.cfm>.

Los vectores adenovíricos están limitados por el tamaño de su genoma (Bett *et al.*, J. Virol. 67:5911-5921, 1993)

Los vectores adenovíricos de la invención incluyen vectores competentes para la replicación e incompetentes para la replicación. Un vector incompetente para la replicación no se replica, o lo hace a niveles muy bajos, en la célula diana. En un aspecto, un vector incompetente para la replicación tiene al menos una región codificadora en E1a, 20 E1b, E2a, E2b o E4 inactivada, por lo general mediante la delección o la mutación de parte o la totalidad de la región codificadora. Los métodos para la propagación de estos vectores son bien conocidos en la técnica.

Los vectores adenovíricos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ADN, ADN encapsulado en un revestimiento de adenovirus, ADN adenovírico empaquetado en otra forma vírica o de tipo vírica (como el herpes simple y VAA), ADN adenovírico encapsulado en liposomas, ADN adenovírico que forma un complejo con polilisina, 25 ADN adenovírico que forma un complejo con moléculas policatiónicas sintéticas, conjugado con transferrina, o que forma un complejo con compuestos tales como PEG para "enmascarar" inmunológicamente la antigenicidad y/o incrementar la semivida, o conjugado con una proteína no vírica.

La partícula del vector adenovírico también puede incluir modificaciones adicionales a la proteína de la fibra, tal como se describe a continuación. En una realización, los vectores adenovíricos de la invención comprenden además un ligando de direccionamiento incluido en una proteína de la cápsida de la partícula. Para ejemplos de adenovirus dirigidos, véanse, por ejemplo, los documentos WO 00/67576, WO 99/39734, US6.683.170, US6.555.368, 30 US5.922.315, US5.543.328, US5.770.442 y US5.846.782.

Además, los vectores adenovíricos de la presente invención también pueden contener modificaciones de otras proteínas de la cápsida vírica. Ejemplos de estas mutaciones incluyen, pero no se limitan a las descritas en los documentos de patente de EE.UU. n° 5.731.190, 6.127.525 y 5.922.315. Otros adenovirus modificados se describen 35 en los documentos de patente de EE.UU. n° 6.057.155, 5.543.328 y 5.756.086.

Los sistemas convencionales para la generación de vectores adenovíricos para la expresión de secuencias insertadas, son conocidos en la técnica y están disponibles a partir de fuentes comerciales, por ejemplo, el sistema de expresión Adeno-X? de Clontech (Palo Alto, CA) (Clontechiques (enero de 2000) pág. 10-12), el sistema de 40 vector adenovírico Adenovator y AdEasy, ambos de Qbiogene (Carlsbad, CA).

### Líneas celulares

La célula tumoral puede ser una línea celular tumoral establecida que se cultiva y se mantiene *in vitro*. Líneas celulares tumorales establecidas incluyen, pero no se limitan a, PC-3 (ATCC n° CRL-1435), Hela (ATCC n° CCL-2), A549 (ATCC n° CCL-185), LNCaP (ATCC n° CRL-1740), H157 (ATCC n° CRL-5802), K562 (ATCC n° CCL-243), 45 Panc 10.05 (ATCC n° CRL-2547; Jaffe *et al.*, Human Gene Therapy 1998; 9:1951-1971; Jaffe *et al.*, Cancer J Sci Am 1998; 4(3): 194-203), Panc 6.03, CG 8020, CG 2505, SK-BR-3 (ATCC n° HTB-30; Fogh *et al.*, 1977), T47D (ATCC n° HTB-133; Keydar *et al.*, 1979), 3SKBR3-7 (Emens *et al.* Hum Gene Ther Mar 2004; 15(3):313-37), 2T47DV (Emens *et al.* 2004), MCF-7, BT-474, HCC-1937 o células H1359. En otra realización, la línea celular modificada genéticamente para aumentar la expresión de un anticuerpo anti-CTLA4 es una célula tumoral aislada a partir de un mamífero y translucida con un vector que causa una mayor expresión del anticuerpo anti-CTLA4. A 50 continuación, la célula tumoral modificada genéticamente se puede administrar de nuevo al mismo mamífero o a un mamífero diferente como parte de una inmunoterapia del cáncer. Se entiende que los descendientes de una célula pueden no ser completamente idénticos (ya sea morfológica, genotípica o fenotípicamente) a la célula progenitora. Además, las células pueden ser o bien una población no seleccionada de células o clones específicos de células. 55 Por ejemplo, las células se pueden modificar genéticamente o seleccionar en busca de altos niveles de expresión del anticuerpo anti-CTLA4, citocina, antígeno tumoral, o cualquier combinación de los mismos. En una realización de la invención, las células son células humanas. En una realización, son células de la próstata. En una realización, las células se crioconservan antes de la administración a un sujeto. En una realización, las células son incompetentes

para la proliferación.

En una realización, las células se pueden mantener en cultivo durante un número de replicaciones y se pueden alterar genéticamente, si es necesario. En una realización, la célula es una célula neoplásica, una célula transformada de forma maligna o la progenie de tales células. Las células se pueden transformar deliberadamente en líneas celulares de larga duración a través de cualquier método, incluyendo, pero no limitado a, fusión con otras líneas celulares, tratamiento con un carcinógeno químico, infección con un virus adecuado, tal como el virus de Epstein-Barr o un virus oncogénico, o transducidas con una región codificante que codifica una proteína que permite una propagación continua (por ejemplo, antígeno T grande de SV40). En una realización, la célula será la progenie de un tumor primario de próstata que se ha establecido en un cultivo *ex vivo*.

Una célula para uso en la puesta en práctica de la invención puede ser una célula tumoral que está modificada genéticamente tal como se detalla en el presente documento. Los tipos de células tumorales a modo de ejemplo se seleccionan a partir del grupo que consiste en una célula de cáncer de cabeza y cuello, una célula de una lesión preneoplásica, una célula cancerosa de tipo polipo, una célula de leucemia, una célula de la vejiga, una célula de la mama, una célula del colon, una célula del riñón (renal), una célula del hígado, una célula del pulmón, una célula del ovario, una célula del cuello uterino, una célula del páncreas, una célula del recto, una célula de la próstata, una célula del estómago, una célula de la epidermis, una célula hematopoyética de estirpe linfoide o mieloides; una célula de origen mesenquimatoso, una célula de melanoma, una célula de teratocarcinoma, una célula de neuroblastoma, una célula de glioma, una célula de adenocarcinoma y una célula no pequeña de cáncer de pulmón.

#### Utilidad de la invención

La invención proporciona composiciones y métodos de inmunoterapia celular para inducir una respuesta inmune frente a células tumorales basándose en el uso de tales vacunas. Las composiciones celulares comprenden células modificadas para expresar uno o varios entre un antígeno tumoral, un anticuerpo anti-CTLA4 y una citocina.

Una realización de la invención es una inmunoterapia del cáncer basada en células que se modifica para expresar un anticuerpo anti-CTLA4 usando el sistema de expresión de inmunoglobulina 2A. Típicamente, las células son del mismo tipo que las células tumorales en el sujeto. Por ejemplo, si un sujeto tiene cáncer de próstata, a continuación, una célula obtenida a partir de una célula de la próstata se modifica genéticamente para expresar uno o varios transgenes tal y como se ha detallado anteriormente en este documento. En otro ejemplo, si un sujeto tiene cáncer de pulmón, a continuación, una célula obtenida a partir del pulmón se modifica genéticamente para expresar uno o varios transgenes tal y como se ha detallado anteriormente en este documento.

Otra realización de la invención es un método para aumentar una respuesta inmune frente a una célula tumoral, un antígeno tumoral, una célula implicada en la angiogénesis o cualquier combinación. La respuesta inmune incrementada puede ser humoral, celular (linfocitos T) o tanto humoral como celular y es preferiblemente sistémica. Preferiblemente, la respuesta inmune sistémica frente al tumor da como resultado la regresión del tumor o la inhibición del crecimiento del tumor, produciendo de este modo un resultado terapéutico mejorado para el sujeto.

#### Métodos de evaluación de la eficacia terapéutica

Las composiciones de la invención también se pueden utilizar para tratar sujetos que pueden tener o no un tumor detectable. Se puede haber diagnosticado al sujeto previamente y tratado o estar en riesgo sustancial de desarrollar cáncer, o se puede haber tratado previamente con otro tipo de terapia. La terapia previa puede haber incluido (pero no se limita a) una extirpación quirúrgica, radioterapia, quimioterapia tradicional, y otros modos de inmunoterapia.

Los medios adecuados para el seguimiento del tumor o el estado de la enfermedad pueden variar en función de las características del tumor. Disminuciones medibles de la masa tumoral se pueden detectar a través de numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen la medición directa de tumores accesibles, el recuento de células tumorales (por ejemplo, presentes en la sangre), mediciones de antígenos tumorales (por ejemplo, antígeno específico de la próstata (PSA), alfa-fetoproteína (AFP)) y diversas técnicas de visualización (por ejemplo IRM, TAC y rayos X). Los siguientes son ejemplos de disminuciones de la tasa de crecimiento de un tumor: disminución de los niveles de AFP en el suero, disminución del tamaño del tumor y/o una reducción de la tasa con la que el tamaño o el número de células de un tumor está creciendo. Las disminuciones en la tasa de crecimiento tumoral se correlacionan con un mayor tiempo de supervivencia para un mamífero con cáncer.

Una respuesta inmune celular general se puede medir como la actividad proliferativa de los linfocitos T en células, en particular PBLs tomados como muestras del sujeto después de la administración de una inmunoterapia. Las células tumorales inactivadas procedentes del mamífero tratado o a partir de las cuales se basa la inmunoterapia, o las células tumorales del mismo tipo de tumor, se utilizan como estimuladores. Un mitógeno no específico tal como PHA sirve como testigo positivo; la incubación con una célula estimuladora no relacionada sirve como testigo negativo. Después de la incubación de las PBMCs con los estimuladores durante un período apropiado (por ejemplo, 5 días), se mide la incorporación de  $[3H]$ -timidina. Si se desea, la determinación del subconjunto de linfocitos T que está proliferando se puede realizar usando citometría de flujo. La citotoxicidad de los linfocitos T (CTL) también se puede medir. En esta prueba, una población de linfocitos T del sujeto se utiliza como efectores en un ensayo estándar de liberación de  $^{51}Cr$ . Las células tumorales se marcan radiactivamente como dianas con aproximadamente

200 microCi de  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  durante 60 minutos a 37°C, seguido de lavado. Los linfocitos T y las células diana (~ $1 \times 10^4$ /pocillo) se combinan entonces en diversas proporciones efector frente a diana en placas de 96 pocillos con fondo en U. Las placas se centrifugan a 100 x g durante 5 minutos para iniciar el contacto celular, y se incuban durante 4-16 horas a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . La liberación de  $^{51}\text{Cr}$  se determina en el material sobrenadante, y se compara con dianas incubadas en ausencia de linfocitos T (testigo negativo) o con 0,1% de TRITON<sup>®</sup> X-100 (testigo positivo). Otros métodos para medir el aumento de las respuestas inmunes incluyen, pero no se limitan a, ensayos basados en anticuerpos (ELISA, RIA, transferencia Western), ensayos celulares específicos de antígenos, ensayos de proliferación, ensayos de células citotóxicas, y en ensayos *in vivo* de hipersensibilidad de tipo retardado con antígeno recombinante asociado a un tumor o fragmentos inmunogénicos o péptidos procedentes del antígeno.

Otros métodos para medir el aumento de las respuestas inmunes incluyen ensayos utilizados actualmente para medir las respuestas de linfocitos T que incluyen, pero no se limitan a, pruebas de hipersensibilidad de tipo retardado, citometría de flujo usando tetrámeros de péptidos del complejo principal de histocompatibilidad, ensayo de linfoproliferación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, ensayo inmunoabsorbente de puntos ligado a enzimas, citometría de flujo de citocinas, ensayo directo de la citotoxicidad, medición de ARNm de citocinas por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa y análisis por dilución limitante. Véase, por ejemplo, Lyerly HK, Semin Oncol. 2003 Jun; 30(3 Supl 8):9-16.

La información obtenida a partir de estos ensayos es útil en la determinación de cómo está respondiendo el paciente después de la administración de las vacunas celulares modificadas genéticamente de la invención. Los resultados de las pruebas pueden ser útiles para mejorar el tratamiento de un sujeto individual. Dosis adicionales de una inmunoterapia celular genéticamente modificada se pueden administrar en su caso, por lo general una vez al mes, quincenal o semanalmente, hasta que se detecta un resultado terapéutico mejorado. A partir de entonces, y sobre todo cuando el beneficio inmunológico o clínico parece disminuir, se pueden administrar dosis de refuerzo o de mantenimiento adicionales, según se requiera.

### Ejemplos

La presente invención se describe haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración y que no están destinados a limitar la invención de ningún modo. Se utilizan métodos convencionales bien conocidos en la técnica o técnicas descritas específicamente a continuación. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar utilizando solo una experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención, descritas específicamente en este documento. Tales equivalentes están destinados a ser incluidos dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

#### Ejemplo 1: Clonación y producción de vectores

Un vector retroviral que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, de un anticuerpo monoclonal anti-CTLA4 murino se generó usando técnicas convencionales de biología molecular. Se construyeron vectores de transferencia para vectores retrovirales y lentivirales que codificaban las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa de un anticuerpo monoclonal anti-CTLA4 de ratón, unidas por un sitio de escisión de furina y la secuencia 2A con autoprocésamiento. Para clonar las secuencias de ADN anti-CTLA4 de ratón, el ARN total se aisló a partir de una línea celular de hibridoma (designada 9D9) que codifica un anticuerpo anti-CTLA4 de ratón anti-IgG2b de ratón. El ARN total se purificó a partir de la línea celular usando un kit de purificación de ARN convencional (Qiagen), y el ADNc se sintetizó con una transcriptasa inversa a partir del ARN total de células 9D9. Las regiones variables y constantes de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se clonaron a partir del ADNc usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de nucleótidos de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales de longitud completa se analizaron usando un sistema de secuenciación automático (Applied Biosystems) y se obtuvieron secuencias de consenso de la región variable a partir de los datos de la secuenciación obtenidos a partir de múltiples reacciones PCR independientes.

Los fragmentos de ADN que codifican la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa, un sitio de escisión de furina, la secuencia 2A y la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa, se unieron entre sí mediante extensión con PCR. Se sintetizaron oligonucleótidos artificiales para la secuencia 2A del VFA, basándose en la secuencia del péptido 2A APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 6). Durante la PCR, se añadió un sitio EcoRI al extremo 5' cebador de la cadena pesada y un sitio Not I al extremo 3' cebador de la cadena ligera. Empleando estos sitios de enzimas de restricción, el fragmento de ADN fusionado cadena pesada - furina - 2A - cadena ligera, se clonó en plásmidos de vectores de transferencia retrovirales y lentivirales.

El plásmido del vector de transferencia retroviral (rkat3F3) utilizado para estos estudios ha sido descrito previamente (Finer *et al.*, Blood 83: 43-50 (1994)), y se modificó posteriormente para contener sitios de enzimas de restricción adicionales que flanqueaban el dominio extracelular de CD4 humano (F3). Los vectores retrovirales se generaron mediante transfección temporal tal y como se ha descrito previamente (Finer *et al.*, Blood 83: 43-50 (1994); Dull *et al.*, J Virol 72: 8463-8471 (1998)).

El sistema de vector lentiviral de tercera generación se ha descrito previamente (Dull *et al.*, J. Virol. 72:8463-8471, 1998). Brevemente, el vector de transferencia contiene un promotor quimérico 5' RSV/LTR, cPPT (Zennou *et al.*, Cell

10:173-185, 2000), un promotor CAG (Miyazaki *et al.*, Gene 79:269-277, 1989) y SIN LTR (Zufferey *et al.*, J. Virol 72:9873-9880, 1998). Para estos estudios, el promotor que dirige la expresión de los anticuerpos se compone de un potenciador de CMV, el promotor de beta-actina de pollo y un donante de corte y empalme, y el aceptor de corte y empalme de beta-globina de conejo (CAG). Los ensayos de producción de vectores, de concentración, de análisis p24 y de titulación se realizaron tal y como se han descrito previamente (Dull *et al.*, J. Virol. 72:8463-8471, 1998). En pocas palabras, los vectores se prepararon mediante transfección temporal en una placa de 10 cm con 6,5 µg de pMDLg/pRRE, 2,5 µg de pRSV-Rev, 3,5 µg de pMD2.VSVG-Env y 10 µg del vector de transferencia.

Las partículas de vectores retrovéricos y lentivéricos se recogieron después de 24 horas, se reunieron, se hicieron pasar a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,2 µg y se concentraron por ultracentrifugación durante 2 horas y 20 min a 19.500 rpm (50.000 g) en un rotor de cubeta oscilante SW28. Los sedimentos se resuspendieron en PBS que contenía 40 mg/ml de lactosa y se almacenaron en partes alícuotas a -80°C. La detección de la proteína gag p24 se evaluó usando un kit de ELISA Alliance VIH-1 p24 (Perkin Elmer).

Ejemplo 2: Creación de varias líneas celulares para inmunoterapia B16F10 y CT26.

La línea celular de melanoma murino B16F10 está disponible comercialmente en la American Type Culture Collection (por ejemplo, número de registro ATCC CRL-6475). La línea celular B16.GM que secreta GM-CSF transducida con retrovirus se ha descrito previamente (Dranoff *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 90: 3539-43 (1993)). Esta línea celular genera 150 ng/10<sup>6</sup> células/24 horas de GM-CSF de ratón. Las células se mantienen en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Hyclone) complementado con 10% de FBS inactivado térmicamente (Hyclone), L-glutamina 2 mM y 1x penicilina/estreptomicina (JRH) en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

La línea celular de carcinoma de colon murino CT26 también está disponible comercialmente en la American Type Culture Collection (por ejemplo, número de registro ATCC CRL-2638). La línea celular CT26.GM se generó utilizando la estructura artificial retrovérica que codifica GM-CSF que se había utilizado en la construcción de B16.GM (Dranoff *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 90: 3539-43 (1993)). Esta línea celular genera 80 ng/10<sup>6</sup> células/24 horas de GM-CSF de ratón. Las células se mantuvieron en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Hyclone) complementado con 10% de FBS inactivado térmicamente (Hyclone), L-glutamina 2 mM y 1x penicilina/estreptomicina (JRH) en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Las líneas celulares progenitoras B16.GM y CT26.GM se transducen con el vector retrovérico que codifica el anticuerpo anti-CTLA4 tal y como se ha descrito previamente (Dull *et al.*, J Virol 72: 8463-8471 (1998)) usando 100:1 de material sobrenadante vírico concentrado. Las células que expresan el anticuerpo anti-CTLA4 se generan con una sola ronda de transducción, y la expresión de la proteína anti-CTLA4 se confirma con ELISA usando kits anti-IgG disponibles comercialmente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 3: El anticuerpo anti-CTLA4 recombinante producido a partir de células tumorales que expresan citocinas, transducidas de forma retrovérica, es funcional y aumenta la expansión de linfocitos T

El siguiente estudio en ratones C57B1/6 muestra que el anticuerpo anti-CTLA4 recombinante producido a partir de células tumorales transducidas con retrovirus que expresan citocinas, es funcional y aumenta la expansión de los linfocitos T. El Día -2, 1-3 x 10<sup>6</sup> esplenocitos procedentes de ratones transgénicos DO11.01, que producen linfocitos T específicos para el péptido OVA<sub>323-339</sub> en el contexto del MHC de clase II I-A<sup>d</sup>, se transfirieron pasivamente por vía intravenosa a ratones receptores BALB/c. El Día 0, a los ratones se les inyectó 500 µg del antígeno sustituto, ovoalbúmina, y el Día 0 y el Día 1 se inyectaron por vía SC dorsal 100 µg de los siguientes anticuerpos purificados: un testigo de IgG2b (ISOTIPO); el anticuerpo anti-CTLA4 expresado a partir del hibridoma murino 9D9 (Hibridoma); el anticuerpo anti-CTLA4 expresado a partir de células B16F10 modificadas genéticamente para expresar GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4 producido por el hibridoma 9D9 (2A-anti-CTLA4); o vehículo testigo (SIN TRATAR). El Día 4, los ratones fueron sacrificados, se extirparon los bazos y los ganglios linfáticos, y se identificaron los linfocitos T que expresaban OVA utilizando el anticuerpo monoclonal específico KJ126, capaz de detectar linfocitos T transgénicos DO11.01 y se evaluaron por análisis FACS. Se muestra el número absoluto de linfocitos T CD4 específicos de ovoalbúmina en el bazo.

Como se muestra en la Figura 3, el anticuerpo anti-CTLA4 expresado desde las células tumorales B16F10 modificadas genéticamente para expresar GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4, y la línea celular progenitora de hibridoma aumentan la expansión de los linfocitos T hasta los mismos niveles esenciales a concentraciones esencialmente idénticas.

Ejemplo 4: El anticuerpo anti-CTLA4 recombinante producido *in vivo* a partir de células tumorales que expresan citocinas transducidas con retrovirus, es funcional y aumenta la expansión de los linfocitos T

El siguiente estudio en ratones C57B1/6 muestra que la administración de una inmunoterapia contra el cáncer que expresa citocinas que también expresa localmente un anticuerpo anti-CTLA, produce una expresión sostenible, sistémica, *in vivo* del anticuerpo anti-CTLA4. El Día 0, los ratones fueron inoculados por vía subcutánea (SC) con 2 x 10<sup>5</sup> células tumorales vivas B16F10. El Día 1, los ratones se dividieron en 5 grupos diferentes: cada grupo recibió una sola administración intraperitoneal (ip) de 15 µg, 50 µg o 150 µg de anticuerpo anti-CTLA4 purificado,

respectivamente; un grupo se inmunizó (SC) con  $1 \times 10^6$  células tumorales B16F10 irradiadas, modificadas genéticamente para expresar GM-CSF; y el último grupo fue inmunizado (SC) con  $1 \times 10^6$  células tumorales irradiadas B16F10, modificadas genéticamente para expresar GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4, y los niveles séricos de anticuerpo anti-CTLA4 se vigilaron durante un período de 18 días.

- 5 Como se muestra en la Figura 3, el anticuerpo anti-CTLA4 expresado en el sitio de la inmunización procedente de las células tumorales B16F10 modificadas genéticamente para expresar GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4, se puede detectar en el suero a niveles bajos, pero sostenibles durante al menos 18 días después de una sola administración de la inmunoterapia del cáncer.

10 Ejemplo 5: La expresión local de un anticuerpo anti-CTLA4 procedente de células tumorales que expresan citocinas transducidas con retrovirus, mejora la supervivencia de animales portadores de tumor a concentraciones bajas de anticuerpo sistémico.

15 El siguiente estudio en un modelo de tumor CT26 en ratones BALB/c, muestra que la inmunoterapia contra el cáncer que expresa citocinas transducidas con retrovirus, que expresa el anticuerpo anti-CTLA4 mejora la supervivencia de los animales portadores de tumores a concentraciones inferiores de anticuerpo sistémico. El Día 0, los ratones BALB/c fueron inoculados por vía subcutánea con  $5 \times 10^5$  células tumorales vivas CT26. Tres días después, los ratones fueron inmunizados con  $1 \times 10^6$  células CT-26 irradiadas que secretaban GM-CSF, o con el mismo número de células CT-26 irradiadas que secretaban tanto GM-CSF como el anticuerpo anti-CTLA4. Los grupos testigo se inmunizaron el Día 3 con  $1 \times 10^6$  células tumorales CT-26 irradiadas secretoras de GM-CSF, y la administración sistémica (intraperitoneal - 150  $\mu\text{g}$ , 10  $\mu\text{g}$ ) o local SC (mezclada con la inmunoterapia del cáncer que expresa citocinas - 10  $\mu\text{g}$ ) de anticuerpo anti-CTLA4 recombinante. Los ratones se vigilaron para detectar la formación de tumores palpables dos veces por semana, y se sacrificaron si los tumores se volvieron necróticos o superaron un tamaño de 1500  $\text{mm}^3$ .

25 La curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones supervivientes ( $n = 10/\text{grupo}$ ) se muestra en la la Figura 4A. En los ratones portadores de tumores CT26, el tratamiento con células de la vacuna CT26 secretoras de GM-CSF solo dio lugar a un 20% de supervivencia el día 42, mientras que el 100% de los ratones que se habían inmunizado con células tumorales CT26 que secretaban GM-CSF y anticuerpo anti-CTLA4, localmente en el sitio de inmunización sobrevivieron. El suero de los animales se recogió el Día 3 después de la administración del anticuerpo y se evaluó para estudiar los niveles de anticuerpo anti-CTLA4 usando un ensayo ELISA (Fig. 4B y 4C). Aunque el 100% de los animales tratados con inmunoterapia contra el cáncer de células tumorales CT-26 que secretaban GM-CSF más la administración sistémica del anticuerpo anti-CTLA4, sobrevivió, los niveles séricos de anti-CTLA4 en este grupo fueron 7 veces mayores que en el grupo que recibió el vacuna que secretaba el anticuerpo localmente. Además, la administración local del anticuerpo procedente de las células secretoras es más potente que la administración local del anticuerpo recombinante, lo que dio como resultado una supervivencia de solo el 50%. Estos datos muestran que la administración local de un anti-CTLA4 a partir de células secretoras de anticuerpo mejora la eficacia de la inmunoterapia del cáncer con una menor exposición a anticuerpos sistémicos.

35 Ejemplo 6: La expresión local de un anticuerpo anti-CTLA4 procedente de células tumorales que expresan citocinas transducidas con retrovirus, mejora la supervivencia de los animales portadores de tumores en un modelo de melanoma B16F10

40 Para evaluar la administración local de anticuerpos anti-CTLA4 en un modelo de tumor diferente, se examinaron células B16F10 que secretaban anticuerpos anti-CTLA4 además de GM-CSF, descritas anteriormente. El Día 0, se estimularon ratones C57BL/6 con  $2 \times 10^5$  células tumorales B16F10 vivas. Los ratones se inmunizaron el Día 1 con  $3 \times 10^6$  células tumorales B16F10 irradiadas secretoras de GM-CSF, o con el mismo número de células B16F10 irradiadas secretoras tanto de GM-CSF como del anticuerpo anti-CTLA4. Un grupo distinto se inmunizó con células tumorales secretoras de GM-CSF irradiadas, y una administración sistémica (intraperitoneal) de anticuerpo recombinante los Días 2 (150  $\mu\text{g}$ ) y 5 (100  $\mu\text{g}$ ). Una segunda ronda de inmunizaciones e inyecciones de anticuerpo se administró a partir del día 14. La carga tumoral se controló y los ratones fueron sacrificados cuando los tumores estimulados llegaron a 1500  $\text{mm}^3$  o se desarrolló una ulceración grave.

50 La curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones supervivientes ( $n = 10/\text{grupo}$ ) de cada grupo se muestra en la Figura 5A. Aunque no sobrevivió ninguno de los ratones tratados con células que expresaban GM-CSF irradiadas, solo sobrevivió el 40% de los ratones en el grupo tratado con el anticuerpo anti-CTLA4 expresado localmente a partir de células de la inmunoterapia del cáncer. El 60% de los ratones en el grupo inmunizado con células tumorales secretoras de GM-CSF y anticuerpo anti-CTLA4 sistémico sobrevivió. El suero se recogió los días 2, 3, 4, 7, 9, 11, 15, 16, 17, 23 y 25, y se determinaron los niveles de anticuerpo anti-CTLA4 empleando un ensayo ELISA (Figuras 5B y 5C). Estos datos muestran que la administración local de anti-CTLA4 procedente de células de inmunoterapia contra el cáncer produce una eficacia antitumoral sin exponer al hospedador a niveles elevados de anticuerpos sistémicos, evitando de este modo la toxicidad asociada al anticuerpo anti-CTLA4 descrita a concentraciones sistémicas elevadas.

55 Ejemplo 7: La expresión local de un anticuerpo anti-CTLA4 procedente de células tumorales que expresan citocinas transducidas con retrovirus produce respuestas mejoradas de los linfocitos T

Células satélite de ratón procedentes de los grupos tratados en el Ejemplo 5 se recogieron el Día 21. Las respuestas específicas de antígeno se contaron mediante un ensayo ELISPOT con IFN-gamma (R&D Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esplenocitos con eritrocitos disminuidos ( $5 \times 10^5$ ) se colocaron en placas y se incubaron durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  con  $1 \mu\text{M}$  del péptido que de unión a Kb obtenido a partir de TRP2 (SVYDFVWL; SEQ ID NO: 11) o  $5 \times 10^3$  células B16F10 irradiadas. Los puntos positivos se contaron usando un servicio de barrido de placas automatizado obtenido a partir de Cellular Technology Ltd. Los ensayos de ELISPOT con IFN-gamma que empleaban TRP2 y estimuladores de B16F10 irradiadas, revelaron que los animales que recibieron las células secretoras de anticuerpo tenían un número incrementado de linfocitos T activados, en relación con los animales tratados con GM-CSF irradiado con o sin administración de anti-CTLA4 sistémico (por ejemplo, véanse las Figuras 6A y B).

Ejemplo 8: La expresión local de un anticuerpo anti-CTLA4 usando un casete F2A produce una disminución de la respuesta autoinmune del anticuerpo

[00208] La administración local de anticuerpos anti-CTLA4 expresados utilizando una estructura artificial 2A se evaluó en el modelo de tumor B16F10 en ratones C57B1/6. En Día 0, los ratones fueron inoculados por vía subcutánea (SC) con  $2 \times 10^5$  células tumorales B16F10 vivas. El Día 1, los ratones se dividieron en 4 grupos diferentes: cada grupo recibió una sola administración intraperitoneal (ip) de HBSS;  $3 \times 10^6$  células tumorales B16F10 irradiadas modificadas genéticamente para expresar GM (B16GM);  $3 \times 10^6$  B16GM irradiadas además de una inyección sistémica de CTLA4 (anti-CTLA4 sistémico y B16GM); o  $3 \times 10^6$  B16GM irradiadas modificadas genéticamente para secretar anti-CTLA4 utilizando un casete F2A (anti-CTLA4 y B16GM F2A). Este régimen de tratamiento se repitió dos veces por semana. En varios momentos se recogió suero y se evaluaron los niveles de anticuerpos anti-nucleares (Fig. 7A), ADNss (Fig. 7B) y ADNds (Fig. 7C) mediante ELISA. Se observó una disminución de los niveles de anticuerpos autoinmunes en ratones tratados con anti-CTLA4 con F2A, en relación con los ratones tratados con anti-CTLA4 sistémico (inyectado).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CELL GENESYS, INC. THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> Composiciones de inmunoterapia contra el cáncer y métodos de uso

5 <130> 3802-224 WO

<140>

<141>

10 <150> 60/788,296

<151> 31-03-2006

<160> 20

15 <170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 19

20 <212> PRT

<213> Virus de la fiebre aftosa

<400> 1

**Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn**

**1 5 10 15**

25 **Pro Gly Pro**

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

30 <213> Virus de la fiebre aftosa

<400> 2

**Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn**

**1 5 10 15**

**Pro Gly Pro**

35 <210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Virus de la fiebre aftosa

40 <400> 3

**Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro**

**1 5 10**

<210> 4

<211> 17

45 <212> PRT

<213> Virus de la fiebre aftosa

<400> 4

**Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly**

**1 5 10 15**

**Pro**

50 <210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Virus de la fiebre aftosa

<400> 5

Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser  
 1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro  
 20

5

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Virus de la fiebre aftosa

10

<400> 6

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly  
 1 5 10 15

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro  
 20

15

<210> 7

<211> 58

<212> PRT

<213> Virus de la fiebre aftosa

<400> 7

Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro  
 1 5 10 15

Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys  
 20 25 30

Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu  
 35 40 45

20

Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro  
 50 55

<210> 8

<211> 40

<212> PRT

<213> Virus de la fiebre aftosa

25

<400> 8

Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val  
 1 5 10 15

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly  
 20 25 30

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro  
 35 40

30

<210> 9

<211> 33

<212> PRT

<213> Virus de la fiebre aftosa

35

<400> 9

Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu  
 1 5 10 15

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly  
 20 25 30

**Pro**

5 <210> 10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético  
 10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)  
 <223> Aminoácido variable  
 15 <400> 10

**Arg Xaa Lys Arg Arg**  
 1 5

20 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la encefalomiocarditis

<400> 11  
**Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu**  
 25 1 5

30 <210> 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <400> 12  
**Ile Glu Asp Gly Arg**  
 1 5

40 <210> 13  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

45 <400> 13  
**Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala**  
 1 5 10

50 <210> 14  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

55



**Arg Arg Lys Arg**  
**1**

<210> 20

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 20

**Arg Arg Arg Arg**  
**1**

15

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición celular para generar una respuesta inmune frente al cáncer en un sujeto humano, que comprende:
  - 5 un antígeno tumoral y una o varias poblaciones de células, en donde al menos una de las poblaciones de células está modificada genéticamente para expresar la secuencia que codifica un polipéptido del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y al menos una de las poblaciones de células está modificada genéticamente para expresar la secuencia que codifica un anticuerpo del antígeno 4 asociado con linfocitos T citotóxicos (CTLA4), en donde las cantidades del antígeno tumoral, el polipéptido de GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4 son terapéuticamente eficaces para generar una respuesta inmune frente al cáncer en el sujeto humano.
  - 10 2. La composición según la reivindicación 1, en la que dicho antígeno tumoral es expresado por una célula.
  3. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que la misma población de células se modifica genéticamente para expresar la secuencia que codifica el polipéptido de GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4.
  4. La composición según la reivindicación 1, en la que dos poblaciones diferentes de células se modifican genéticamente para expresar la secuencia que codifica el polipéptido de GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4.
  - 15 5. La composición según la reivindicación 1 o 4, en la que al menos una de dichas una o más poblaciones de células modificadas genéticamente son células tumorales.
  6. La composición según las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha población de células que expresa un antígeno tumoral se modifica genéticamente para expresar la secuencia que codifica el polipéptido de GM-CSF y el anticuerpo anti-CTLA4.
  - 20 7. La composición según la reivindicación 6, en la que dicho anticuerpo anti-CTLA4 se expresa empleando un vector que comprende:
 

en la dirección 5' a 3', un promotor ligado funcionalmente a la secuencia que codifica la primera cadena de un anticuerpo anti-CTLA4, un sitio de escisión proteolítica, una secuencia que codifica un sitio de escisión con autoprocesamiento y la secuencia que codifica la segunda cadena de un anticuerpo anti-CTLA4, en donde la secuencia que codifica el sitio de escisión con autoprocesamiento se inserta entre la secuencia que codifica la primera cadena y la segunda cadena de dicho anticuerpo anti-CTLA4.
  - 25 8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha población de células que expresa el antígeno tumoral se modifica genéticamente para expresar la secuencia que codifica el polipéptido de GM-CSF.
  - 30 9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha población de células que expresa el antígeno tumoral se modifica genéticamente para expresar la secuencia que codifica el anticuerpo anti-CTLA4.
  10. La composición según la reivindicación 9, en la que dicho anticuerpo anti-CTLA4 se expresa empleando un vector que comprende:
 

en la dirección 5' a 3', un promotor ligado funcionalmente a la secuencia que codifica la primera cadena de un anticuerpo anti-CTLA4, un sitio de escisión proteolítica, una secuencia que codifica un sitio de escisión con autoprocesamiento y la secuencia que codifica la segunda cadena de un anticuerpo anti-CTLA4, en donde la secuencia que codifica el sitio de escisión con autoprocesamiento se inserta entre la secuencia que codifica la primera cadena y la segunda cadena de dicho anticuerpo anti-CTLA4.
  - 35 40 11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que al menos una población de dichas células es autóloga.
  12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que al menos una población de dichas células es alogénica.
  - 45 13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que al menos una población de dichas células son células con efecto vecindad.
  14. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para uso en un método de tratamiento de un cáncer mediante la generación de una respuesta inmune frente a dicho cáncer.

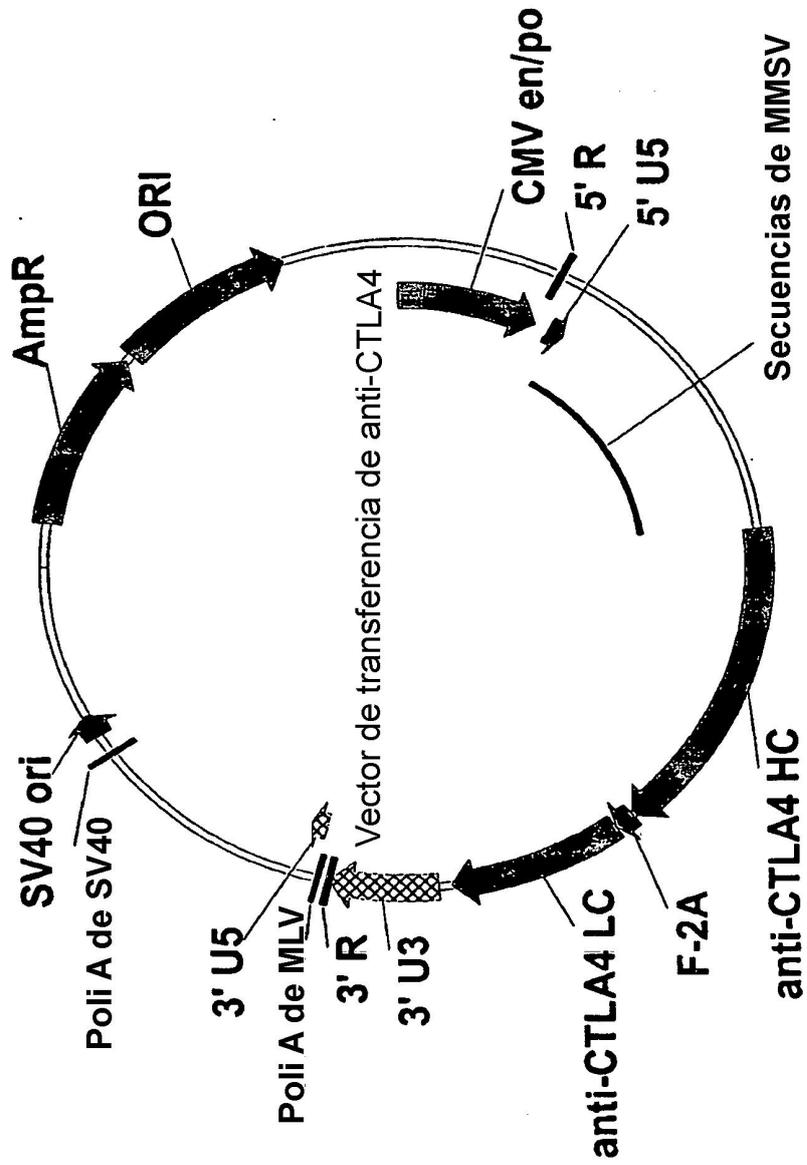


Figura 1

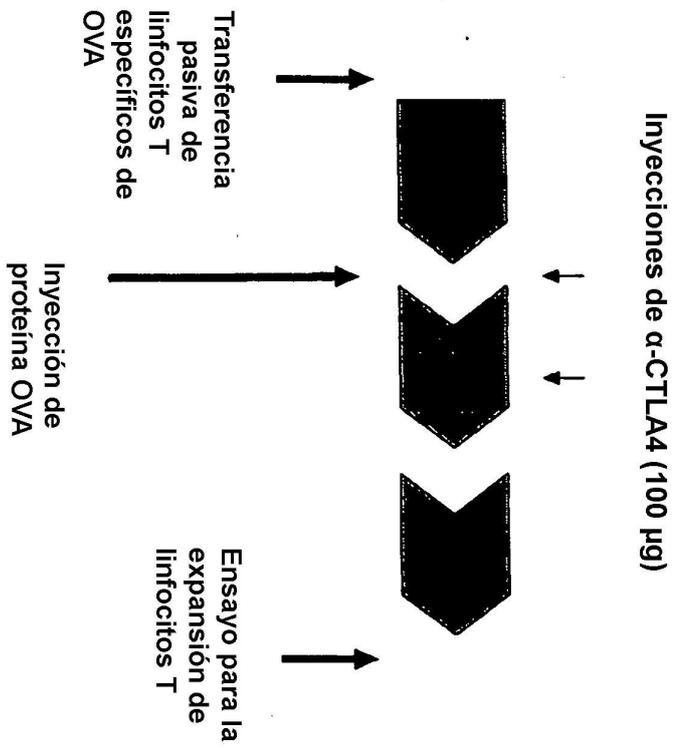


Fig. 2A

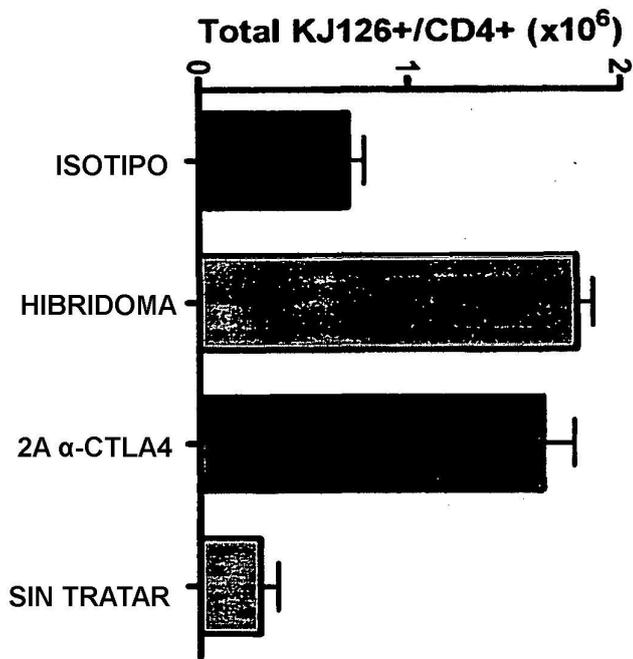


Fig. 2B

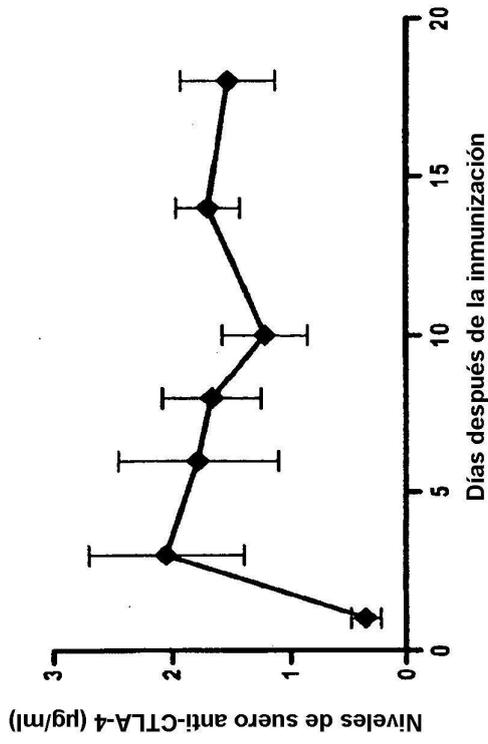


Fig. 3B

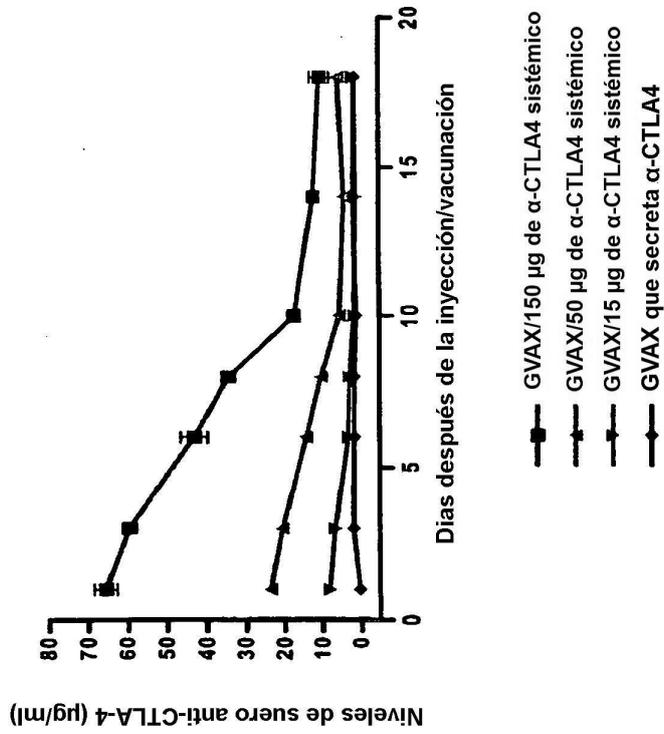
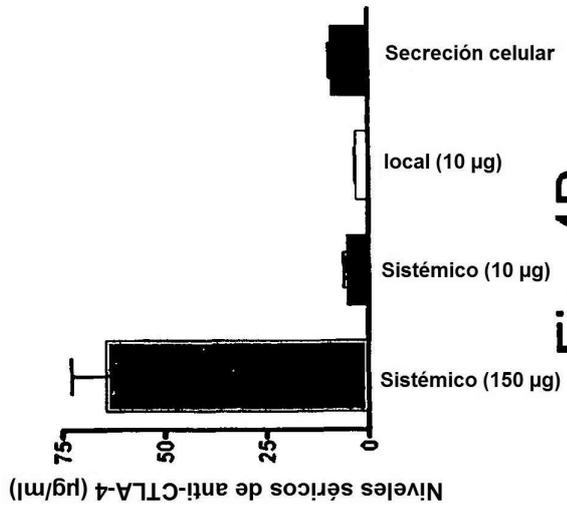
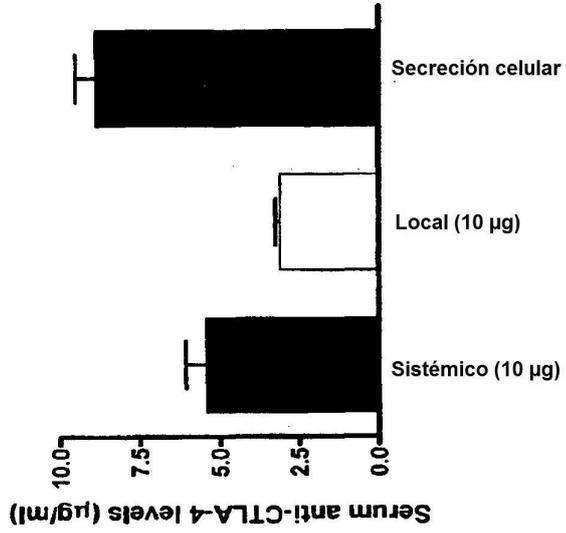
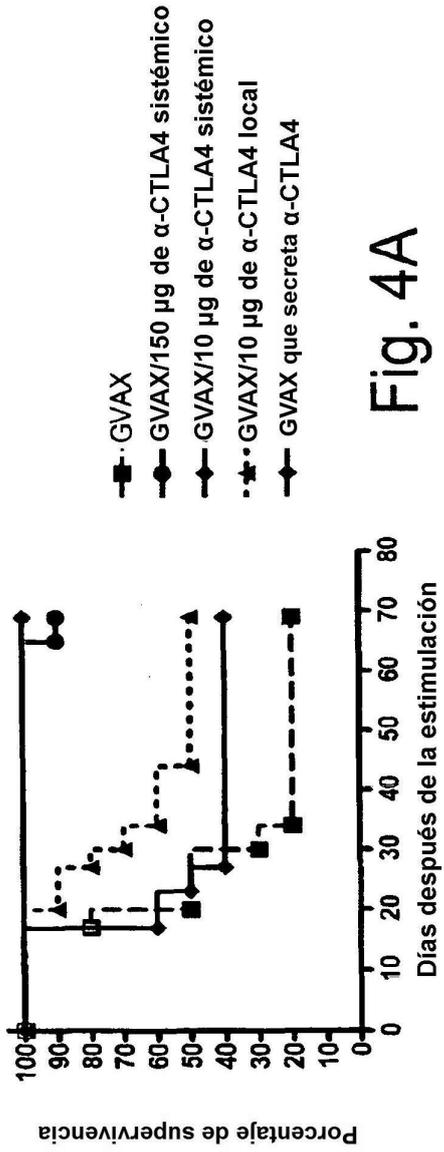


Fig. 3A



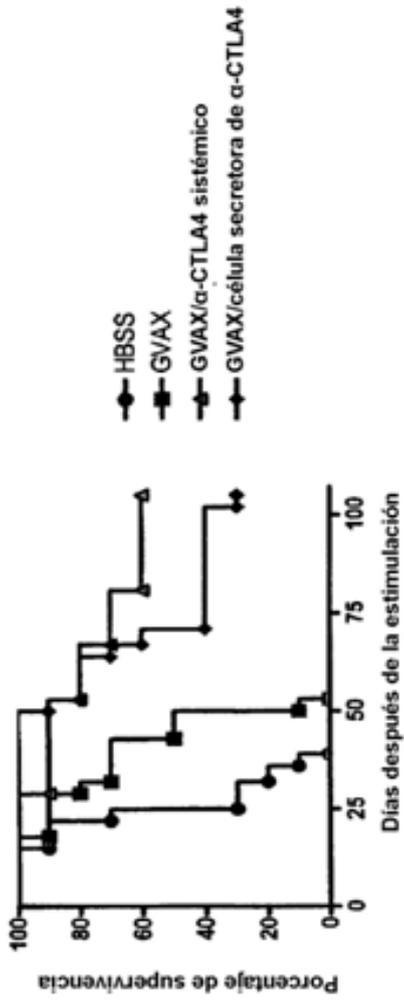


Fig. 5A

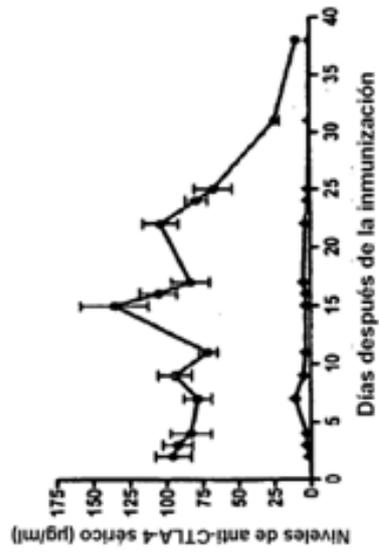


Fig. 5B

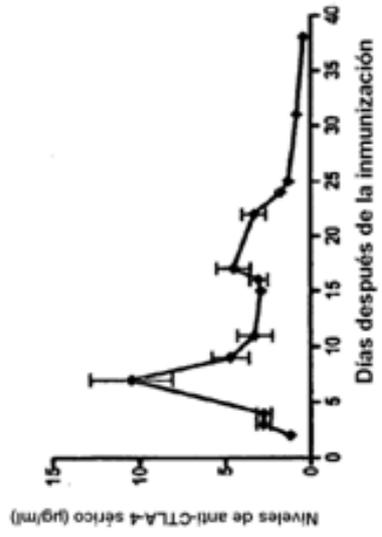


Fig. 5C

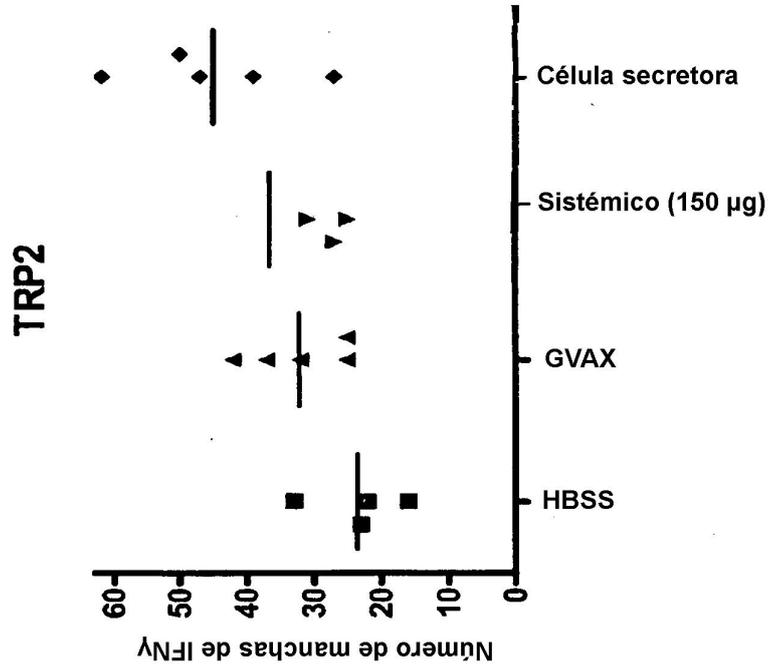


Fig. 6B

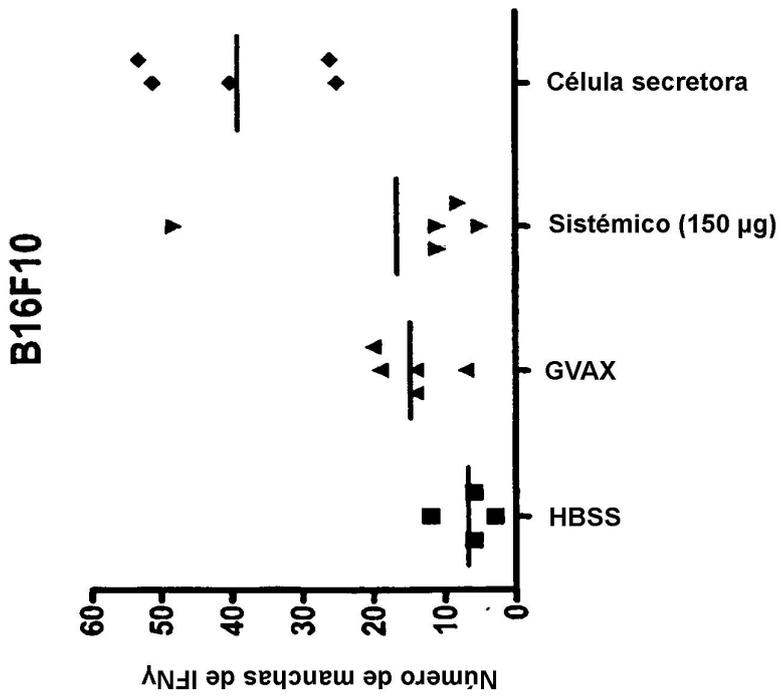


Fig. 6A

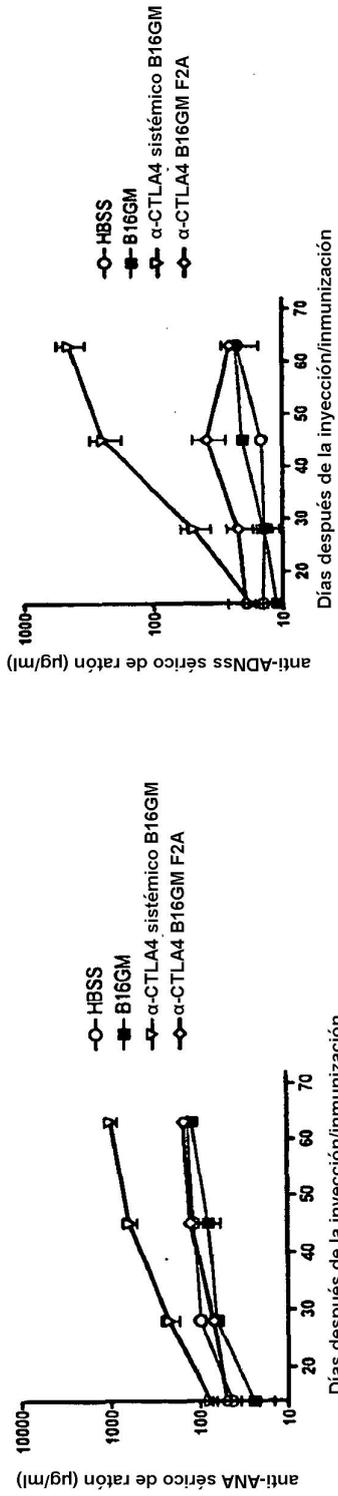


Fig. 7A

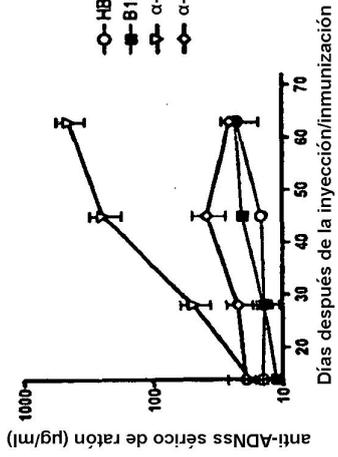


Fig. 7B

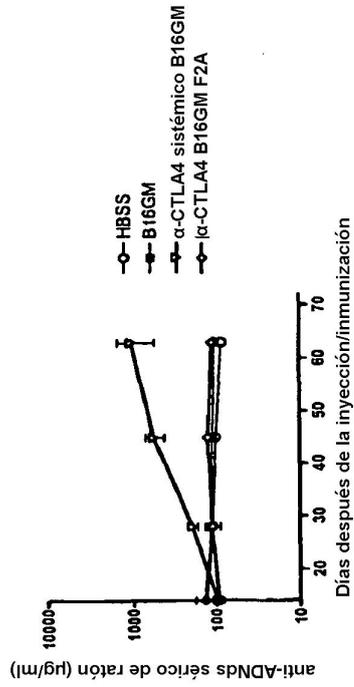


Fig. 7C