

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 896**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2005 PCT/US2005/042782**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2006 WO06065495**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2005 E 05852204 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 1814580**

54 Título: **Procedimientos de uso de la IL-21 en la inmunoterapia adoptiva y la identificación de antígenos tumorales**

30 Prioridad:

24.11.2004 US 630727 P

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

16.02.2017

73 Titular/es:

**FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH
CENTER (100.0%)
1100 FAIRVIEW AVENUE NORTH
SEATTLE, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

YEE, CASSIAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 601 896 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

Procedimientos de uso de la IL-21 en la inmunoterapia adoptiva y la identificación de antígenos tumorales

Antecedentes de la invención

5 Las citocinas en general estimulan la proliferación o la diferenciación de las células del linaje hematopoyético o participan en los mecanismos de respuesta inflamatoria e inmunitaria del cuerpo. Las interleucinas son una familia de citocinas que intervienen en las respuestas inmunitarias. Uno de los elementos primordiales de la respuesta inmunitaria es el linfocito T, que produce numerosas citocinas e interviene en la inmunidad adaptativa frente a los antígenos. Las citocinas producidas por el linfocito T se clasifican como de tipo 1 y tipo 2 (Kelso, A. Immun. Cell Biol. 76:300-317, 1998). Las citocinas de tipo 1 incluyen la IL-2, el IFN- γ y la LT- α , e intervienen en las respuestas inflamatorias, la inmunidad contra los virus y contra los parásitos intracelulares así como en el rechazo de los aloinjertos. Las citocinas de tipo 2 incluyen las IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, e intervienen en las respuestas humorales, en la inmunidad contra helmintos y en la respuesta alérgica. Las citocinas compartidas entre los tipos 1 y 2 son la IL-3, el GM-CSF y el TNF- α . Existen ciertos indicios que indican que las poblaciones de linfocitos T encargadas de la producción de las de tipo 1 y tipo 2 migran preferentemente hacia distintos tipos de tejido inflamado.

Se ha demostrado que la IL-21 es un potente modulador de los linfocitos T citotóxicos y de las células NK. (Parrish-Novak, et al. Nature 408:57-63, 2000; Parrish-Novak, y col., J. Leuk. Bio. 72:856-863, 2002; Collins y col., Immunol. Res. 28:131-140, 2003; Brady, et al. J. Immunol. 172:2048-58, 2004.) Las respuestas de los linfocitos T incluyen la potenciación de la respuesta primaria al antígeno como la modulación de las funciones de los linfocitos T de memoria.

En estudios en murinos, la IL-21 potencia la maduración y la función efectora de las células NK y promueve la activación de los linfocitos T como respuesta a un aloantígeno (Kasaian y col., Immunity 16:559-569, 2002). Como citocina que limita la expansión de las células NK y promueve la activación de los linfocitos T CD8 del ratón, se cree que la IL-21 interviene en la transición de la inmunidad innata a la adaptativa (Kasaian, supra, 2002). Entre los linfocitos T CD4, a la IL-21 se la ha descrito tanto como una citocina propia de los Th1 (T cooperadores 1, del inglés *helper*) que regula al alza la expresión de los genes asociados con la inmunidad innata (Strengell y col., J. Immunol. 170:5464, 2003) como una propia de los Th2 que inhibe la diferenciación de los linfocitos Th vírgenes en linfocitos Th1 productores de IFN-gamma (Wurster y col., J. Exp. Med. 196:969, 2002). Los efectos de la IL-21 sobre el desarrollo de la inmunidad innata y de las respuestas de los Th CD4 han sido bien estudiados (Strengell supra, 2003; Strengell y col., J. Leukoc. Biol. 76:416, 2004), pero su papel en la respuesta de los linfocitos T CD8+ específicos de antígeno, sobre todo en el ser humano, no ha sido investigado a fondo. La presente descripción provee procedimientos para inducir una respuesta por parte de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y dotados de alta afinidad mediante la administración de IL-21. La inducción de una respuesta CD8 de alta afinidad contra autoantígenos, que cada vez acaparan mayor protagonismo como posibles dianas inmunitarias en la inmunoterapia contra el cáncer demuestra el papel relevante de la IL-21 en las estrategias antitumorales específicas de antígeno. Así pues, la presente descripción da a conocer procedimientos para administrar la IL-21 como adyuvante en vacunas antitumorales. La presente invención proporciona procedimientos para la expansión en condiciones *ex vivo* de linfocitos T citotóxicos específicos de antígenos tumorales para el uso en la inmunoterapia adoptiva, tal y como se definen en las reivindicaciones. La presente descripción proporciona procedimientos para la administración de la IL-21 como adyuvante de vacunas y para la expansión en condiciones *ex vivo* de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno en general contra virus y contra otros antígenos diana. Estos y otros usos serán evidentes para las personas versadas en la materia a partir de las enseñanzas plasmadas en la presente memoria.

El documento WO 03/103589 describe el uso de la IL-21 en el cáncer y en otras aplicaciones terapéuticas.

El documento US 2003/0147869 describe un sistema y procedimientos para promover la expansión de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y policlonales en respuesta a ACP artificiales.

Vari & Hart, Cytotherapy, febrero de 2004, Vol. 6(2), páginas 111-121, describe la carga de células dendríticas (CD) con antígenos (Ag).

Kasaian MT y col., Immunity Vol. 16(4), abril de 2002, páginas 559-569 describe que la IL-21 limita las respuestas de las células NK y promueve la activación de linfocitos T específicos de antígeno. Sivakumar PV y col., Immunology, Vol. 112(2), junio de 2004, páginas 177-182, describe que la interleucina 21 es una citocina propia de los linfocitos T cooperadores que regula la inmunidad humoral y las respuestas antitumorales celulares.

MA H-L y col., J. Immunology, Vol. 171 (2), 15 julio 2003, páginas 608-615, describe que la IL-21 activa tanto la inmunidad innata como la adaptativa para generar potentes respuestas antitumorales que precisan de las perforinas pero son independientes del IFN-gamma. Moroz A y col., J. Immunology, Vol. 173(2), 15 julio 2004, páginas 900-909, describe que la IL-21 potencia y mantiene las respuestas de los linfocitos T CD8+ para lograr una inmunidad antitumoral duradera.

Li Y. y col., J. Immunology, Vol. 27(6), 2004, páginas S2-S3, describe que la modulación mediante citocinas facilita la generación en condiciones *in vitro* de linfocitos T específicos de antígeno destinados a la inmunoterapia adoptiva. Brentjens RJ y col., Nature Medicine, Vol. 9(3), marzo de 2003, páginas 279-286, describe la erradicación de tumores sistémicos de linfocitos B mediante linfocitos T humanos genéticamente dirigidos y coestimulados con CD80 e interleucina-15.

Foster y col., Current Pharmaceutical Design, Bol. 10(11), octubre de 2004, páginas 1207-1220, describe usos y aplicaciones en condiciones *ex vivo* de las citocinas para la inmunoterapia adoptiva contra el cáncer.

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar un antígeno tumoral, el cual comprende: el cultivo de material tumoral aislado de un paciente junto con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y en presencia de una composición de IL-21 y de células presentadoras de antígeno (APC); el aislamiento de una población de linfocitos T CD8+ del cultivo, en que el número de linfocitos T específicos del antígeno tumoral producidos es más de 20 a 30 veces mayor que el número de linfocitos T específicos del antígeno tumoral producidos sin la presencia de la IL-21; la clonación de linfocitos T CD8+ individuales a partir de esa población de linfocitos T CD8+; y la identificación del antígeno mediante la caracterización de los clones de linfocitos T por su especificidad antigénica.

La presente descripción proporciona un procedimiento para identificar un antígeno tumoral que comprende el cultivo de material tumoral de un sujeto junto con una población aislada de linfocitos T que no están diferenciados terminalmente y en presencia de una composición de IL-21; la clonación de linfocitos T individuales a partir de la población de linfocitos T; y la caracterización de los clones de linfocitos T por su especificidad antigénica. En una realización, la población aislada de linfocitos T no incluye linfocitos CD4+.

En determinadas realizaciones de los procedimientos de la invención, las PBMC o la población de linfocitos T CD8+ es una población de células autólogas. En otras realizaciones, el material tumoral comprende ARN total, células tumorales lisadas, o cuerpos apoptóticos. En otra realización, el cultivo simultáneo se produce en presencia de la composición de IL-21 y de una o varias citocinas más.

La invención proporciona un procedimiento para preparar una población de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno para el uso en la inmunoterapia adoptiva, el cual comprende: aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de una muestra biológica, en que dichas PBMC comprenden una población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes; la identificación de PBMC provistas de un fenotipo que sea histocompatible con un paciente que padece un tumor; aislamiento de una población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes a partir de dichas PBMC histocompatibles; cultivo del material tumoral aislado del paciente junto con la población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes en presencia de una composición de IL-21 y de células presentadoras de antígeno (APC), en que dicho material tumoral comprende un antígeno tumoral; y expansión de las células en el cultivo, con lo que el número de linfocitos T humanos CD8+ específicos del antígeno tumoral producidos es más de 20 a 30 veces mayor que el número de linfocitos T humanos CD8+ específicos del antígeno tumoral producidos sin la presencia de la IL-21.

La invención proporciona un procedimiento para preparar una población de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno para el uso en la inmunoterapia adoptiva, el cual comprende: identificación, a partir de una muestra biológica humana aislada que contiene linfocitos T, de una población de linfocitos T humanos provistos de un fenotipo que sea histocompatible con un paciente afectado por un tumor; aislamiento de una población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes a partir de esa población de linfocitos T humanos histocompatibles; cultivo del material tumoral aislado del paciente junto con la población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes en presencia de una composición de IL-21 y de APC, en que dicho material tumoral comprende un antígeno tumoral; y expansión de esas células en cultivo, con lo que el número de linfocitos T humanos CD8+ específicos del antígeno tumoral producidos es más de 20 a 30 veces mayor que el número de linfocitos T humanos CD8+ específicos del antígeno tumoral producidos sin la presencia de la IL-21.

La invención proporciona un procedimiento para la expansión en condiciones *ex vivo* de linfocitos T CD8+ citotóxicos humanos y específicos de antígeno, el cual comprende: identificación, a partir de una muestra biológica humana aislada que contiene linfocitos T, de una población de linfocitos T humanos provistos de un fenotipo que sea histocompatible con un paciente; aislamiento de una población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes a partir de dicha población de linfocitos T humanos histocompatibles; cultivo del material tumoral aislado del paciente junto con la población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes en presencia de una composición de IL-21, en que dicho material tumoral comprende un antígeno tumoral; y expansión de esas células en cultivo, con lo que el número de linfocitos T CD8+ citotóxicos humanos específicos del antígeno tumoral producidos es más de 20 a 30 veces mayor que el número de linfocitos T CD8+ citotóxicos humanos específicos de antígeno tumoral producidos sin la presencia de la IL-21.

La invención también proporciona el uso de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral y expandidos para la fabricación de un medicamento de inmunoterapia adoptiva destinado a un paciente afectado por un tumor, en el cual los dichos linfocitos T humanos poseen un fenotipo que es histocompatible con el paciente, y en que dichos linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral han sido cultivados junto con material

tumoral del paciente en presencia de IL-21 y de APC; y en el que dichos linfocitos T son CD28+ y capaces de producir IL-2, y dicha población de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral, CD28+ y productores de IL-2 se cultiva y se expande sin la presencia de otras citocinas adicionales.

5 La invención también proporciona linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral, CD28+, productores de IL-2 y expandidos, preparados mediante el cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provistas de un fenotipo histocompatible con el paciente junto con material tumoral aislado del paciente, en presencia de IL-21 y de APC, que produce una población de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral que es CD28+ y capaz de producir IL-2, y expandidos mediante su cultivo sin la presencia de otras citocinas adicionales, para el uso como inmunoterapia adoptiva en el paciente afectado por el tumor.

10 La invención también proporciona linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral y expandidos para el uso como inmunoterapia adoptiva en un paciente afectado por un tumor, en el cual los linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral poseen un fenotipo que es histocompatible con el paciente, y en que los linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral han sido cultivados junto con material tumoral del paciente en presencia de IL-21 y de APC, y en el que los linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral son CD28+ y capaces de producir IL-2, y en que dicha población de linfocitos T humanos CD8+ específicos del antígeno tumoral, CD28+ y productores de IL-2 se cultiva y con ello se expande sin la presencia de otras citocinas adicionales.

20 En otro aspecto, la presente descripción da a conocer un procedimiento para la preparación de una población de linfocitos T para el uso en inmunoterapia adoptiva que comprende la identificación de PBMC provistas de un fenotipo histocompatible con un paciente afectado por un tumor, su cultivo junto con material tumoral o con péptidos asociados a tumor del paciente con las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en presencia de una composición de IL-21 y de APC; expansión de esas células en cultivo; y reintroducción de esas células en el paciente. Las PBMC pueden ser autólogas. La población de linfocitos T puede ser autóloga. El material tumoral puede comprender ARN total, células tumorales lisadas o cuerpos apoptóticos. En otra realización, las PBMC o los linfocitos T son alogénicos.

25 En otro aspecto, la presente descripción da a conocer un procedimiento de preparación de una población de linfocitos T para el uso en la inmunoterapia adoptiva que comprende la identificación de una población de linfocitos T provista de un fenotipo histocompatible con un paciente afectado por un tumor, el cultivo de material tumoral del paciente junto con la población de linfocitos T en presencia de una composición de IL-21 y de APC, la expansión de dichos linfocitos en cultivo y la reintroducción de los mismos en el paciente. La población de linfocitos T puede ser virgen o no diferenciada terminalmente. La población de linfocitos T puede ser autóloga. El material tumoral puede comprender ARN total, células tumorales lisadas o cuerpos apoptóticos.

Breve descripción de las figuras

35 Las figuras 1 y 2 ilustran que la IL-21 potencia la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de MART-1. En condiciones *in vitro* se estimuló a linfocitos T CD8+ procedentes de tres donantes sanos HLA-A2+ (CG, NE y LD) con células dendríticas maduras y autólogas pulsadas con el péptido M26 de MART-1, tal y como se describe en los ejemplos.

40 Figura 1. El séptimo día posterior a la estimulación, se recolectaron 10^6 linfocitos de cada grupo experimental y se tiñeron con 20 $\mu\text{g/ml}$ de tetrámeros de MHC/péptido (PE; eje vertical) y con un colorante vital (PI o DAPI, eje horizontal). Los datos se expresan en forma de porcentaje de linfocitos tetrámero+ entre los linfocitos seleccionados (linfocitos CD8+ purificados).

45 Figura 2. En A se muestra la cifra absoluta en millones de linfocitos tetrámero+ correspondientes a los cultivos no tratados y a los tratados con IL-21 procedentes de los donantes CG, NE y LE, así como el incremento en número de veces de las cifras absolutas en los cultivos tratados con IL-21 con respecto a los cultivos no tratados. C. Cultivos derivados de un donante sano normal (CG) y de un paciente con melanoma metastásico (ST) se analizaron siete días después de la primera (Estim. 1ª) y de la segunda estimulación (Estim. 2ª); en la primera estimulación una parte de los cultivos contenía IL-21 y otra no. Tras la segunda estimulación se añadieron IL-2 e IL-7. Los datos se expresan en forma de porcentaje de los linfocitos tetrámero+ entre los linfocitos seleccionados (linfocitos CD8+ purificados). Los resultados indicados son representativos de tres experimentos independientes efectuados con cada uno de los donantes.

50 La figura 3 ilustra que la exposición a otras citocinas de cadena gamma, a saber, IL-2, IL-7 o IL-15, no estimula la generación de CTL específicos del antígeno. En condiciones *in vitro* se estimuló a linfocitos T CD8+ procedentes de un donante sano HLA-A2+ con células dendríticas maduras y autólogas pulsadas con el péptido M26 del MART-1, tal y como se describe en los ejemplos. El séptimo día posterior a la estimulación, se recolectaron 10^6 linfocitos de cada grupo experimental y se tiñeron con 20 $\mu\text{g/ml}$ de tetrámeros de MHC/péptido (PE; eje vertical) y con un colorante vital (PI o DAPI, eje horizontal). Los datos se expresan en forma de porcentaje de linfocitos tetrámero+ entre los linfocitos seleccionados (linfocitos CD8+ purificados). Los datos son representativos de cultivos de tres donantes HLA-A2+.

60 La Figura 4 ilustra que los linfocitos tratados con la IL-21 mostraron un incremento de su proliferación y menos apoptosis durante la estimulación primaria *in vitro*. Poblaciones purificadas de linfocitos vírgenes (CD45RA⁺,

CD62L⁺) se preincubaron con CFSE y se estimularon con el péptido MART-1 en presencia de IL-21 (*IL-21-treated*; tratados con IL-21) y sin ella (*No Cytokine*; sin citocina). El séptimo día, los linfocitos se tiñeron con complejos de tetrámeros MHC-péptido de MART-1 conjugados con ficoeritrina (PE) y se analizó la fracción de ellos que se hallaba en proceso de división celular (CFSE) y en apoptosis (anexina V). Las células teñidas con CFSE perdieron intensidad en su fluorescencia con las sucesivas divisiones. Los resultados se expresan en forma de porcentaje de células tetrámero+ en estado quiescente (recuadro derecho), en división (central) y en rápida división (izquierdo). En lo que respecta a las células en apoptosis, las células tetrámero+ teñidas con anexina V aparecen representadas en forma de porcentaje en el cuadrante superior derecho.

La figura 5 ilustra que la IL-21 influye principalmente en los linfocitos T CD8+ vírgenes que en los homólogos de memoria. En poblaciones altamente purificadas de linfocitos T vírgenes (CD45RA⁺, CD62L⁺) y de memoria (CD45RO⁺) derivadas de un donante normal sano (CG) y de un donante con melanoma (ST) se evaluó la inducción de respuestas específicas de antígeno frente al péptido MART-1 en presencia y en ausencia de la IL-21. El porcentaje de CTL específicos de MART-1 se expresa en forma de porcentaje de linfocitos tetrámero+ entre el total de linfocitos seleccionados (linfocitos CD8+ purificados) tras dos ciclos de estimulación *in vitro*. Los resultados son representativos de experimentos efectuados con otros dos donantes sanos normales (NE y LD) y otros dos pacientes donantes (AM y RE).

La figura 6 ilustra que la IL-21 induce preferentemente la generación de CTL específicos de antígeno que muestran una alta avidéz hacia este. Se aislaron clones individuales de linfocitos T CD8+ específicos de MART-1 a partir de cultivos estimulados sin (Control) y con la presencia de IL-21 (IL-21). De 8 a 12 clones de CTL representativos de cada situación experimental se evaluaron para determinar la afinidad por su diana en un ensayo de liberación de cromo (CRA, por sus siglas en inglés) con células T2 pulsadas con concentraciones decrecientes del péptido M26 (análisis por titulación de la dosis de péptido). Los datos se expresan en forma de la concentración (nM) necesaria para alcanzar el 50% de la lisis máxima de las células diana. En promedio, los clones de CTL generados en presencia de la IL-21, precisaron una menor dosis de péptido para la lisis específica que los clones de CTL generados sin dicha citocina que sirvieron como control (* p < 0,01). A: donante sano, CG (•); B: paciente con melanoma, ST (Δ). Esos mismos clones se evaluaron para determinar su reactividad específica contra una estirpe de células tumorales MART1+ (526) a una razón E/T de 10 a 1 en un ensayo de liberación de cromo ⁵¹Cr (CRA) convencional de 4 horas. Se apreció una lisis sustancialmente mayor del tumor positivo para el antígeno (526 •, A) que del tumor negativo para el mismo (375 ○, Δ) por parte de los clones CTL aislados del cultivo tratado con IL-21 con respecto a los aislados del cultivo que no contuvo citocina como control († p < 0,01). C: donante sano, CG (●, ○); D: paciente con melanoma, ST (Δ, ▲). Los resultados son representativos de 3 donantes sanos normales y de 3 pacientes donantes.

La figura 7 ilustra que en los cultivos tratados con IL-21 abundan más los CTL que demuestran tener una alta afinidad en el ensayo de disociación de los tetrámeros unidos a los TCR. El ensayo de disociación de los tetrámeros, que muestra la fracción de tetrámeros que permanecen unidos con el paso del tiempo en presencia de un exceso de tetrámeros sin marcar, sirvió como medida indirecta de la velocidad de disociación del TCR o de la afinidad de los TCR de cada clon individual. A lo largo de un intervalo de tiempo concreto (2 a 60 minutos) se comparó la fracción de clones de CTL específicos de MART-1 marcados con tetrámeros-PE que se aislaban de los cultivos tratados con IL-21 (●) con la de los clones procedentes de los cultivos no tratados (○). El ritmo de pérdida de la intensidad de la fluorescencia (%) de la tinción con tetrámeros respecto al momento 0 es inverso a la afinidad por los TCR. Los resultados son representativos de 4 donantes.

La figura 8 ilustra que los cultivos tratados con IL-21 dieron como resultado una población de CTL específicos de antígeno CD28^{hi}. Las células se recolectaron tras la preestimulación de las PBMC, y de nuevo, siete días después de la estimulación con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido MART-1 en presencia y sin presencia de IL-21. Las células se tiñeron con tetrámeros-MART-1 y simultáneamente con CD45RA o con CD45RO, CD28 y CCR7 (Figura 7). Se efectuó un análisis por histograma de los marcadores fenotípicos individuales con los linfocitos teñidos con el tetrámero-MART-1 que fueron seleccionados. También queda demostrada la expresión del CD28 en los linfocitos teñidos con el tetrámero y seleccionados que se extrajeron del cultivo 27 días después de la estimulación. Estos datos son representativos de cultivos de tres donantes.

La figura 9 ilustra la producción de IL-2 tras la estimulación específica de antígeno de CTL que expresaban con profusión el CD28 (CD28^{hi}) y escasamente el mismo (CD28^{low}). Se seleccionaron los linfocitos T CD8+ tetrámero+ MART-1 procedentes de los cultivos tratados con la IL-21 (CD28^{hi}) y no tratados con ella (CD28^{low}) que se cultivaron bien junto con células T2 no pulsadas, bien con células T2 solas pulsadas con el péptido de MART-1 (M26), o bien con CTLA4-Ig (0,5 µg/ml) para bloquear la interacción entre B7 y CD28. Los sobrenadantes se recogieron 48 h después y se analizaron con ELISA para detectar la presencia de la IL-2. Se observa tanto la inducción específica de la producción de IL-2 entre los CTL específicos de MART-1 que expresan CD28^{hi} tras la estimulación con el antígeno, como su inhibición por la CTLA4-Ig, lo cual sugiere que la inducción de la IL-2 en los linfocitos tratados con la IL-21 depende del CD28. Los resultados corresponden a la media de ensayos por triplicado; se muestran las barras de error.

La figura 10 ilustra la producción de la IL-2 tras la estimulación específica de antígeno de CTL que expresaban con profusión el CD28 (CD28^{hi}) y escasamente el mismo (CD28^{low}). Se seleccionaron linfocitos CD8 tetrámero+ MART-1 procedentes de los cultivos tratados y no tratados con la IL-21 y se cultivaron bien junto con células T2 no pulsadas, bien con células T2 solas pulsadas con el péptido MART-1, o bien con CTLA4-Ig para bloquear la interacción entre B7 y CD28. Los sobrenadantes se recogieron 48 h después y se analizaron con ELISA para detectar la presencia de la IL-2. Se observó la inducción específica de la producción de IL-2 entre los CTL específicos de MART-1 que expresaban CD28^{hi} tras la estimulación con el antígeno y la inhibición por parte de la

CTLA4-Ig. Los resultados corresponden a la media de ensayos por triplicado.

La Figura 11 ilustra que la IL-21 influye en la respuesta de los linfocitos T CD8 frente a la gp100 y el antígeno NY-ESO-1. Se estimularon linfocitos T CD8 en condiciones *in vitro* con células dendríticas autólogas pulsadas con NY-ESO-1 o con el péptido gp100. A los cultivos destinados a ser tratados con la IL-21 se les añadió esta citocina. Seis días después de la estimulación primaria *in vitro* se analizaron los cultivos para determinar la especificidad antigénica y el fenotipo de la superficie mediante la tinción con tetrámeros y el análisis multiparamétrico por citometría de flujo. En el recuadro A, se muestra la frecuencia de CTL específicos del G154 y del NY-ESO-I en forma de porcentaje del total de linfocitos T CD8 junto a las ventanas de análisis (*gates*) enmarcadas. Se calculó el incremento de la cifra absoluta de CTL específicos del NY-ESO-1 a partir del número de células presentes en los respectivos cultivos y, en el caso del NY-ESO-1, se comprobó que los linfocitos que habían sido tratados con la IL-21 eran casi 20 veces más numerosos. Recuadro B. Se analizaron los linfocitos tetrámero+ seleccionados procedentes de los cultivos de control y de los tratados con IL-21 para determinar la expresión de CD8. Todos los linfocitos eran CD45RO+, CCR7-. El análisis por histogramas de la expresión de CD28 entre los CTL específicos del NY-OEST-1 o de gp10000 mostró que este aparecía notablemente regulado al alza en los cultivos tratados con la IL-21 con respecto a los controles. Estos resultados son representativos de seis experimentos independientes de tres individuos HLA-2+.

La figura 12 ilustra que la adición de la IL-21 a la IL-6 y a las IL-12, IL-2, IL-7 o IL-15 solas potencia sustancialmente la respuesta de los linfocitos T CD8, en comparación con la IL-6 y con las IL-12, IL-2, IL-7 o IL-15 solas.

La figura 13 ilustra que la IL-21 puede elevar la frecuencia de los linfocitos T hasta niveles lo bastante altos para posibilitar la expansión y la transferencia adoptiva sin precisar ningún otro enriquecimiento de linfocitos T específicos del antígeno.

Descripción de la invención

Antes de pasar a describir pormenorizadamente la invención, puede ser útil definir los términos siguientes para facilitar la comprensión:

El término “variante alélica” se usa en la presente memoria para designar cualquiera de las dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. Las variantes alélicas surgen de modo natural a causa de mutaciones y pueden dar como resultado polimorfismos fenotípicos en las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (no causar cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con una secuencia de aminoácidos alterada. El término variante alélica también se usa en la presente memoria para designar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

Los términos “amino-terminal” y “carboxi-terminal” se emplean en la presente memoria para designar posiciones dentro de los polipéptidos. Donde el contexto se presta, ambos términos se usan para aludir a una secuencia o porción particulares de un polipéptido con el fin de indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, cierta secuencia situada en posición carboxi-terminal con respecto a una secuencia de referencia dentro del mismo polipéptido está situada más cerca del extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

El término “cáncer” o “célula cancerosa” se usa en la presente memoria para designar un tejido o célula presente en una neoplasia que posee características que lo diferencian del tejido o de las células del tejido normales. Entre tales características figuran, entre otras: grado de anaplasia, morfología irregular, contorno celular poco definido, tamaño del núcleo, cambios en la estructura del núcleo o del citoplasma, otros cambios fenotípicos, presencia de proteínas celulares indicadoras de un estado canceroso o precanceroso, número incrementado de mitosis, y capacidad de metastatizar. Las palabras pertenecientes a “cáncer” incluyen carcinoma, sarcoma, tumor, epiteloma, leucemia, linfoma, pólipo y escirro, transformación, neoplasia, y similares.

El término “coadministración” se usa en la presente memoria para designar que un polipéptido o proteína de IL-21 y una segunda molécula terapéutica se pueden administrar simultáneamente o en momentos distintos. La coadministración puede ser una sola administración simultánea de la IL-21 y de la segunda molécula terapéutica o múltiples ciclos de coadministración. La coadministración no es necesariamente la única vez que se administra al paciente la IL-21 o la segunda molécula terapéutica.

El término “tratamiento de combinación” se usa en la presente memoria para designar que a un paciente se le administra como mínimo una dosis terapéuticamente eficaz de IL-21 y una segunda molécula terapéutica. La IL-21 puede ser un polipéptido maduro, un fragmento, fusión o conjugado del mismo que demuestra tener la actividad biológica de la IL-21.

El término “potenciar” usado en referencia a una respuesta inmunitaria se usa en la presente memoria para designar el incremento de la escala y/o la eficiencia de una respuesta inmunitaria o la ampliación de la duración de la respuesta inmunitaria. El término se usa indistintamente con “aumento”. Una respuesta inmunitaria incluye, sin limitarse a ello, una actividad citolítica o apoptótica potenciada, o incrementos en el número de linfocitos T CD8+ o de su supervivencia.

El término “aislado”, cuando se aplica a un polinucleótido, designa que el polinucleótido ha sido eliminado de su medio genético natural y por tanto queda libre de otras secuencias codificantes indeseadas o extrañas, y se halla en una forma adecuada para el uso en sistemas de producción de proteínas genéticamente modificadas. Tales moléculas aisladas son aquellas que se separan de su entorno natural e incluyen el ADNc y los clones genómicos.

5 Las moléculas aisladas de ADN de la presente invención están exentas de otros genes con los que suelen estar vinculadas ordinariamente, pero pueden incluir regiones no traducidas 5' y 3' presentes de forma natural como promotores y terminadores. La identificación de las regiones asociadas será evidente para cualquier persona versada en la materia (véase por ejemplo, Dynan and Tijan, Nature 316:774-78, 1985).

10 Un polipéptido o proteína “aislado” es un polipéptido o proteína que se halla en un estado distinto al de su entorno original, como apartado de la sangre o de un tejido animal. En una realización preferida, el polipéptido aislado está sustancialmente exento de otros polipéptidos, en particular de otros polipéptidos de origen animal. Es preferible proporcionar los polipéptidos en forma altamente purificada, es decir, una pureza superior al 95% y más preferiblemente superior al 99%. Cuando se usa en este contexto, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, como dímeros o como alternativa, formas glucosiladas o derivatizadas.

15 El término “nivel” cuando se refiere a células inmunitarias, como las células NK, los linfocitos T, en particular los linfocitos T citotóxicos, los linfocitos B y similares, concierne al número de células o a la actividad de estas células. Un nivel elevado consiste en un mayor número de células o en una mayor actividad de la función celular.

20 El término “nivel” en alusión a las infecciones víricas se refiere a un cambio en el nivel de la infección viral e incluye, sin quedar limitado a ello, a cambios en el nivel de CTL o de células NK (tal y como se han descrito antes), un descenso de la carga viral, un incremento del título de anticuerpos antivíricos, un descenso de los niveles serológicos de alanina aminotransferasa, o una mejora determinada a través del examen histológico de un tejido u órgano de interés. La determinación de si tales cambios de nivel son diferencias o cambios significativos forma parte de las aptitudes del entendido en la materia.

25 El término “neoplásico”, cuando se refiere a las células, indica células sometidas a una proliferación nueva o anormal, en particular en un tejido en el que la proliferación progresa sin control desembocando en una neoplasia. Las células neoplásicas pueden ser malignas, esto es, invasivas y metastásicas, o benignas.

30 Un “polinucleótido” es un polímero mono o bicatenario compuesto de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que se lee del extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden ser aislados de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro*, o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. El tamaño de los polinucleótidos se expresa en forma de pares de bases (abreviadas “pb”), nucleótidos (“nt”) o kilobases (“kb”). Cuando el contexto se presta, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias se usa para designar la longitud total y se entiende como equivalente al término “pares de bases”. Las personas versadas en la materia reconocerán que las dos cadenas del polinucleótido bicatenario pueden diferir ligeramente en su longitud y que los extremos de las mismas pueden quedar escalonados como resultado de la escisión enzimática; así pues, es posible que no todos los nucleótidos de la molécula bicatenaria estén apareados.

35 Un “polipéptido” es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, que puede ser producido de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de unos 10 residuos de aminoácidos se denominan habitualmente “péptidos”.

40 Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, como grupos de carbohidratos. Los carbohidratos y los otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a la proteína por la célula en que se produce la proteína, y variar según el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria en términos de su estructura primaria de aminoácidos; los sustituyentes como los grupos de carbohidratos en general no se especifican, pese a poder estar presentes.

45 El término “receptor” designa una proteína asociada a la célula que se une a una molécula bioactiva (un ligando) y media en el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura multipéptidica que comprende un dominio extracelular de unión a ligando y un dominio efector intracelular que normalmente interviene en la transducción de la señal. La unión del ligando al receptor provoca un cambio de conformación en el receptor que propicia la interacción entre el dominio efector y otras moléculas de la célula. Esta interacción a su vez conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los procesos metabólicos que están vinculados a las interacciones del receptor con el ligando incluyen la transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos de la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de los lípidos de la membrana, adhesión celular, hidrólisis de los lípidos de inositol e hidrólisis de los fosfolípidos. En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana o ser citosólicos o nucleares; monoméricos (p. ej. el receptor de la tirotropina o el receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (p. ej., receptor del PDGF, receptor de la somatotropina, receptor de la IL-3, receptor del GM-CSF, receptor del G-CSF, receptor de la eritropoyetina y receptor de la IL-6).

Las masas moleculares y las longitudes de los polímeros determinadas con procedimientos analíticos imprecisos (p. ej., electroforesis en gel) se entenderán como valores aproximados. Cuando un valor tal se expresa como "unos" X o "aproximadamente" X, el valor indicado de X se debe entender como preciso hasta un $\pm 10\%$.

5 La presente descripción se refiere al uso de la IL-21 para aumentar la proliferación y la supervivencia de linfocitos T específicos de antígeno. La potenciación por parte de la IL-21 de los linfocitos T específicos de antígeno será útil para aumentar la frecuencia de tales linfocitos T, enriquecer las poblaciones de esos mismos linfocitos dotados con mayor afinidad, y generar una población de linfocitos T específicos de antígeno que expresen con profusión el CD28 y tengan un fenotipo "independiente de los cooperadores" (Widmer y col., Nature 294:750, 1981; Topp y col., J. Exp Med 198(6):947, 2003; Cheng y col., J Immunol 169:4990, 2002).

10 En ciertos aspectos la presente descripción da a conocer procedimientos que comprenden el cultivo de linfocitos T vírgenes en presencia de una composición de IL-21 y de un antígeno que dan como resultado una población de linfocitos T citotóxicos que posee una afinidad más elevada por un antígeno que los linfocitos T cultivados sin la presencia de la IL-21. De particular interés son los antígenos tumorales. Los linfocitos T específicos de antígeno provistos de alta afinidad tienen la capacidad de reconocer y de destruir el tumor, mientras que el linfocito T de baja afinidad si bien puede mostrar especificidad hacia el antígeno tumoral puede no reconocer ni matar la célula tumoral. La afinidad del linfocito T hacia el tumor depende en parte de la densidad del antígeno que la célula tumoral esté presentando. Si la presentación del antígeno por parte de la célula tumoral es baja, entonces es más probable que solo los linfocitos T de alta afinidad sean capaces de reconocerla y de iniciar su citólisis. Los procedimientos de la presente invención (tal y como se definen en las reivindicaciones) pueden servir para aumentar la frecuencia de los linfocitos T hasta niveles lo bastante altos para facilitar la expansión y la transferencia de células adoptivas sin precisar ningún otro enriquecimiento de linfocitos T específicos de antígeno, lo cual reduce enormemente el tiempo necesario hasta recibir el tratamiento y obvia la necesidad de selección o clonación.

25 En otro aspecto de la presente descripción, los procedimientos descritos en la presente memoria comprenden la creación de una población de CTL específicos de antígeno que poseen una alta afinidad hacia autoantígenos mediante el cultivo de linfocitos T que no se han diferenciado terminalmente en contacto con una composición de IL-21. En una realización, los linfocitos T son linfocitos T vírgenes aislados. Una vez la población de linfocitos T específicos de antígeno se ha multiplicado en condiciones *ex vivo*, se le reintroducen al paciente. En determinadas realizaciones, al paciente se le seguirá administrando la IL-21, lo que podrá hacerse junto con otros tratamientos.

30 En otro aspecto, la presente descripción da a conocer procedimientos para potenciar el repertorio de antígenos que son reconocidos por una población de linfocitos T. Los procedimientos comprenden el cultivo de material tumoral junto con una estirpe de células tumorales o un derivado de las mismas (ARN total, células tumorales lisadas, cuerpos apoptóticos, etc.) con linfocitos T autólogos aislados de un sujeto. El material tumoral y los linfocitos T se cultivan en presencia de una composición de IL-21, y tras dejar que los linfocitos T proliferen, se procede a clonarlos. Los linfocitos T específicos de antígeno se identifican y a continuación se analizan a fin de caracterizar su especificidad antigénica.

A. Descripción de la IL-21.

40 La IL-21 humana (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) fue designada originalmente como Ligando $\alpha 11$, y aparece descrita en las patentes compartidas de EE.UU. N.º 6.307.024, y 6.686.178. El receptor de la IL-21 aparece descrito en la patente de EE.UU. 6.057.128. El receptor de la IL-21, antes designada $\alpha 11$ (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6), y el receptor heterodimérico IL-21R/IL-2R γ también aparece descritos en las patentes compartidas de EE.UU. 6.576.744, 6.803.451, 6.692.924 y en el documento WO 00/17235. Tal y como aparece descrito en esas publicaciones, la IL-21 se aisló de una genoteca de ADNc generada a partir de células de sangre periférica humanas activadas (hPBC), que fueron seleccionadas en virtud de poseer CD3. El CD3 es un marcador de la superficie celular exclusivo de las células de origen linfocítico, en particular de los linfocitos T.

45 La secuencia de aminoácidos del IL-21 R indicó que el receptor codificado pertenecía a la subfamilia de receptores de citocinas de la clase I que incluye, entre otros, los receptores de las IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, la EPO, la TPO, el GM-CSF y el G-CSF (véase una revisión en: Cosman, "The Hematopoietin Receptor Superfamily", en Cytokine 5(2): 95-106, 1993). El receptor de la IL-21 ha sido hallado en las células NK y en los linfocitos T y B, lo cual indica que la IL-21 actúa en células del linaje hematopoyético, en concreto en las células progenitoras linfocíticas y en las células linfocíticas. Otras citocinas de las llamadas con haz de cuatro hélices que actúan sobre las células linfocíticas son las IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15. Véase una revisión de ese tipo de citocinas en Nicola y col., Advances in Protein Chemistry 52: 1-65, 1999 y en Kelso, A., Immunol. Cell Biol. 76:300-317, 1998.

55 En el caso de la IL-21, la secuencia señal de secreción comprende los residuos de aminoácido 1 (Met) a 29 (Ser), y un polipéptido maduro que comprende los residuos de aminoácido 30 (Gln) a 162 (Ser) (como se muestra en la SEQ ID NO: 2). La secuencia de polinucleótidos correspondiente se muestra en la SEQ ID NO: 1. Las personas versadas en la técnica reconocerán que la secuencia revelada en la SEQ ID NO: 1 representa un único alelo de la IL-21 humana y cabe esperar que la variación alélica y el ajuste alternativo hayan tenido lugar.

B. Uso de la IL-21 en los tratamientos vacunales, la inmunoterapia adoptiva y la identificación de antígenos específicos de tumor

La presente invención (tal y como se define la reivindicaciones) se basa en parte en un estudio con donantes sanos humanos y con pacientes con melanoma en el que se demostró que la IL-21 ejercía una función reguladora positiva en la inducción de la respuesta primaria por parte de linfocitos T CD8+ humanos específicos de antígeno. Por medio de tetrámeros de péptido-MHC que permitían detectar una escasa pero cuantificable población de linfocitos T vírgenes que reconocía un autoantígeno normal, se comprobó que la frecuencia y la cifra absoluta de linfocitos T CD8 específicos de antígeno se multiplicaban más de 20 veces en presencia de la IL-21 que en los cultivos que crecieron sin la presencia de la IL-21. La generación de la respuesta potenciada de los linfocitos T específicos de antígeno parece ser exclusiva de esta citocina con receptor de cadena gamma, puesto que la adición de la IL-2, la IL-7 o la IL-15 durante la sensibilización inicial no tuvo ningún efecto añadido en los cultivos que no habían recibido dicha citocina. Los linfocitos T sensibilizados con el antígeno y expuestos a la IL-21 retuvieron la capacidad para responder a las citocinas promotoras del crecimiento, como la IL-2 y la IL-7, y pudieron ser aislados y multiplicados con facilidad. La presente invención da a conocer la generación potenciada por la IL-21 de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno humanos que se caracterizan por tener regulado al alza el CD28 y la expresión de TCR de alta afinidad, lo que da como resultado la producción de IL-2 independiente de los linfocitos T cooperadores activados por el antígeno, una mayor avidéz por la diana y una mayor acción citolítica contra el tumor que es específica de antígeno. La presente invención da a conocer procedimientos definidos en las reivindicaciones, con los cuales la IL-21 se usa para inducir respuestas por parte de linfocitos T CD8+ humanos específicos de antígeno, que es útil para la inmunoterapia, en particular para la terapia con células adoptivas.

En los estudios descritos en la presente memoria, la respuesta específica de antígeno potenciada por la IL-21 se limitó a la población de linfocitos T vírgenes y no a los homólogos de memoria mediante el uso de linfocitos T respondedores preseleccionados. Los linfocitos T vírgenes no han estado expuestos nunca al antígeno y tienen el potencial de reconocer y de unirse a un solo antígeno único. El antígeno tumoral es un péptido o un polipéptido o un complejo peptídico que posee un perfil de expresión distinto con respecto al antígeno presente en las células no tumorales. Por ejemplo, el antígeno no tumoral puede ser expresado por las células tumorales con una frecuencia o densidad mayor que las células no tumorales. El antígeno tumoral puede diferir del antígeno no tumoral en su estructura, por ejemplo, el antígeno se puede expresar en forma de un polipéptido truncado, puede tener alguna mutación en la secuencia de aminoácidos o en la secuencia polinucleotídica que lo codifica, estar mal plegado, o sufrir una modificación postraducciona inadecuada. La similitud con los antígenos que están presentes en las células no tumorales normales en el organismo hospedador permite a las células tumorales eludir los mecanismos de vigilancia inmunitarios del hospedador.

La observación de que los antígenos asociados a tumor generan respuestas inmunitarias específicas que atacan a los tumores dotó a los investigadores del fundamento para desarrollar tratamientos oncológicos basados en antígenos tumorales específicos. No obstante, los tumores expresan multitud de antígenos, muchos de los cuales no han sido aislados ni caracterizados. Además, no todos los antígenos tumorales se expresan en niveles lo bastante altos como para estimular una respuesta inmunitaria suficiente.

En los últimos años, a partir del ADNc de células tumorales humanas se han descubierto numerosos genes que codifican antígenos tumorales reconocibles por los linfocitos T citotóxicos (Gomi y col., J. Immunol. 163:4994-5004, 1999). Algunos ejemplos incluyen los genes HER/neu (Peoples y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 92:432-436, 1995) y el CASP-8 mutante (Mandrizzato y col., J. Exp. Med., 186:785-793, 1997). De los pacientes se pueden aislar linfocitos T específicos de antígenos tumorales, pero mantener esos linfocitos T en cultivo ha resultado difícil. Los linfocitos T específicos de antígenos tumorales pueden estar localizados en la sangre, en el tejido linfoide como es el bazo, o bien en el propio tumor. Por regla general, se practica una biopsia para obtener tejido tumoral y se cultiva una suspensión de células en condiciones *in vitro*. Se ha probado que las células tumorales específicas de antígeno sobreviven más tiempo si cuentan con la presencia de citocinas, tales como IL-2, IL-7, IL-4 e IL-15 (Vella y col., PNAS 95:3810-3815, 1998). En la presente invención, la adición de la IL-21 a cultivos de linfocitos T específicos de antígenos tumorales en presencia de la presentación primaria del antígeno por parte de células dendríticas provoca un aumento significativo de la cifra absoluta de linfocitos T específicos de antígeno que supera lo observado con las IL-15, IL-6, IL-12, 2 o IL-7 solas. Así pues, la presente invención da a conocer procedimientos (tal y como se define en las reivindicaciones) para identificar nuevos antígenos específicos de tumores y procedimientos para potenciar las poblaciones de linfocitos T específicos de antígenos tumorales con el fin de que ataquen a esos tumores mediante la exposición de dichos linfocitos T a la IL-21 (tal y como se define en las reivindicaciones). Los procedimientos para ampliar el repertorio de antígenos reconocidos por una población de linfocitos T mediante la generación de líneas celulares específicas de tumor surgen tras haber demostrado que las composiciones a base de IL-21 potencian la proliferación de las poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno cuando el antígeno es presentado por linfocitos T no terminados diferencialmente. Los procedimientos comprenden el cultivo de material tumoral como una estirpe de células tumorales o un derivado de las mismas (ARN total, células tumorales lisadas, cuerpos apoptóticos, etc.) junto con linfocitos T autólogos aislados de un sujeto. El material tumoral y los linfocitos T se cultivan en presencia de una composición de IL-21, y tras dejar que los linfocitos T proliferen, se procede a enriquecerlos, por ejemplo, clonando dichos linfocitos T. En determinadas realizaciones, la administración de la IL-21 reduce al mínimo la necesidad de IL-2 o de otros factores de crecimiento. En otras realizaciones, no es necesario

que el cultivo contenga linfocitos T CD4+. Los linfocitos T específicos de antígeno se identifican y se analizan para caracterizar su especificidad antigénica (Véanse, van der Bruggen Science 254: 1643, 1991 y Engelhard y col., Mol. Immunol. 39: 127, 2002).

5 Es sabido que un gran número de linfocitos T específicos de MART-1 forman parte de la población virgen (Pittet et al, J. Exp. Med. 190:705, 1999), pero que también se pueden detectar frecuencias sustanciales de tales linfocitos T en la población de memoria (D'Souza y col., Int. J. Cancer 78:699, 2004), sin que estos se lleguen a multiplicar en presencia de la IL-21. En el caso de los pacientes con melanoma, el encuentro previo con células tumorales portadoras del antígeno puede desencadenar una transducción de la señal defectuosa entre los linfocitos T de memoria, lo cual impide que respondan a la estimulación de la proliferación propiciada por la IL-21 en condiciones *in vitro* (Zippelius, et al, Cancer Res. 64:2865, 2004; Lee y col., Nature Medicine 5:677, 1999).

10 Los linfocitos T sensibilizados con el antígeno experimentan una mayor proliferación y menos apoptosis cuando son expuestos a la IL-21 que sus homólogos no tratados, por consiguiente, se dan a conocer procedimientos para potenciar las vacunas basadas en linfocitos T y un adyuvante como tratamientos inmunológicos contra el cáncer. El tratamiento con IL-21 propició la regulación al alza de la expresión de CD28 y enriqueció una población de linfocitos T que expresaban un fenotipo único estable: CD8+, CD45RO+, CD28^{hi} y CCR7-. A este fenotipo se le puede caracterizar como intermedio entre un linfocito T virgen (CD45RO-, CD28+, CCR7+) y uno de memoria (CD45RO+, CD28-, CCR7-/+). (Tomiyama, y col., J. Exp. 198:947, 2003). Los linfocitos T CD8+ CD28+ representan unos CTL potencialmente más eficaces para la inmunoterapia adoptiva, puesto que pueden proporcionar una señal autocrina activada por el antígeno para la proliferación. Tales linfocitos T CD8 independientes de los linfocitos cooperativos no precisarían ninguna ayuda externa en forma de linfocitos T CD4+ o de IL-2 para sobrevivir y multiplicarse (Ho y col., Cancer Cell 3:431, 2003; and Topp y col., J. Exp. Med. 198:947, 2003). Así pues, la presente invención permite tratar una enfermedad inmunomediada facilitándole al paciente una población de linfocitos T CD8+ provista de una actividad citotóxica potenciada sin contar o contar con la escasa presencia de citocinas, como la IL-2, o de linfocitos T CD4+. Los procedimientos son especialmente útiles para la multiplicación en condiciones *ex vivo* de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno, pero también podría ser útil en condiciones *in vivo* cuando esas citocinas adicionales provocan efectos secundarios indeseados o cuando las poblaciones de linfocitos CD4+ están comprometidas.

15 Los ejemplos dados a conocer en la presente memoria demuestran que la exposición a la IL-21 durante la estimulación primaria *in vitro* también propicia la generación de clones de linfocitos T específicos de antígeno dotados de una afinidad sistemáticamente mayor y mayor avidez por las células diana. Estos clones aparecieron representados por diversos TCR V betas, lo cual sugiere que esto probablemente no era el fruto de una población expandida a partir de un pequeño número de clones con alta afinidad, sino más bien de un efecto general sobre el repertorio de linfocitos T. Estudios precedentes han mostrado que cuando al cultivo se le incorporan citocinas como la IL-10, que regula a la baja la capacidad estimuladora de las APC, la probabilidad de aislar clones de linfocitos T provistos de alta afinidad aumenta (Tsai y col., Critical Rev. Immunol. 18:65, 1998). Se ha comprobado que la IL-21 detiene el proceso de maduración de las células dendríticas de ratón, lo cual reduce la expresión del MHC y disminuye la capacidad estimuladora de la activación de los linfocitos T (Brandt y col., Blood 102:4090, 2003). Con todo, en ese caso, la IL-21 se añadió a células dendríticas humanas que ya habían completado la maduración. En estudios preliminares, la adición de la IL-21 a las células dendríticas maduras no alteró la expresión en su superficie de las moléculas del MHC de clase I HLA-DR, CD80, CD83 y CD86 en comparación con las células dendríticas no tratadas. Sin pretender limitarse a la teoría, los resultados indican que la expresión frustrada de las moléculas estimuladoras en la superficie probablemente no explique la potenciación de la generación de linfocitos T con alta afinidad en condiciones *in vitro*. La preincubación de las células dendríticas humanas maduras con la IL-21 tampoco tuvo efecto alguno sobre la frecuencia o la afinidad de los linfocitos T CD8+ tetrámero+ que pudieron generarse.

20 El uso de la IL-21 para aumentar la respuesta por parte de los linfocitos T CD8 específicos de antígeno ha sido estudiada en modelos de ratón y se ha hallado que resulta muy eficaz a la hora de erradicar los tumores agresivos (Ma y col., J. Immunol. 171:608, 2002; Kishida y col., Mol. Ther. 8:552, 2003; Moroz y col., J. Immunol 173:900, 2003). El efecto selectivo de la IL-21 sobre los linfocitos T vírgenes con respecto a los de memoria parece indicar una mayor influencia durante la sensibilización, y de hecho, los estudios en ratones revelan un potente efecto sensibilizador que se caracteriza por una lenta respuesta de rechazo y la inducción de una dilatada memoria antitumoral. La IL-21 fomenta la supervivencia a largo plazo de los linfocitos T CD8 específicos de antígeno previamente activados como resultado de la disminución de su apoptosis a través de un mecanismo indeterminado, pero en el que posiblemente intervenga la fosforilación de STAT3 o la inducción de un fenotipo central de memoria (Brenne y col., Blood 99:3756, 2002). Algunos de tales efectos pueden ser atribuibles a la regulación al alza del CD28 entre los linfocitos T CD8 tratados con la IL-21.

25 Los procedimientos basados en el uso de poblaciones de linfocitos T como células adoptivas para el tratamiento de pacientes humanos son conocidos por los médicos versados en la materia. En tales procedimientos se pueden usar poblaciones de linfocitos T preparadas de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente memoria y conocidos en la materia. Por ejemplo, el tratamiento con células adoptivas por medio de linfocitos infiltrados en el tumor, con linfocitos T específicos de un antígeno MART-1 ha sido puesto a prueba en la práctica clínica (Powell y col., Blood 105:241-250, 2005). Se ha vacunado a pacientes de carcinoma de células renales con células tumorales autólogas irradiadas. Las células recolectadas se activaron de forma secundaria con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 y con IL-2, y después se volvieron a administrar a los pacientes (Chang y col., J. Clinical Oncology 21: 884-890,

2003).

La presente descripción da a conocer procedimientos para potenciar la inmunoterapia adoptiva dotando al paciente de un nivel reforzado de inmunidad mediante la estimulación de linfocitos en condiciones *ex vivo* y su posterior readministración a dicho paciente. Las células son histocompatibles con el paciente y pueden ser alogénicas o autólogas. El procedimiento de preparación comprende el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del paciente, la multiplicación de tales células en cultivo hasta obtener un gran número de ellas en un medio de cultivo que contenga una composición de IL-21, y la posterior reintroducción de dichas células en los pacientes. El crecimiento de tales células efectoras, que incluyen células NK, células LAK y linfocitos T específicos de tumor, puede requerir otras citocinas adicionales como la IL-2 (Dudley y col., *J. Immunother.* 24:363-73, 2001) o la IL-15 (Marks-Konczalik y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:11445-50 2000; Waldmann TA. *Nat Med.*, 9:269-77, 2003; Fehniger y col., *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13: 169-83,2002.) Una vez transferidas de nuevo las células a los pacientes, se recurre a procedimientos para mantener su viabilidad mediante el tratamiento de los pacientes con citocinas que pueden incluir la IL-21 y la IL-2 (Bear y col., *Cancer Immunol. Immunother.* 50:269-74, 2001; and Schultze y col., *Br. J. Haematol.*113:455-60, 2001). Como alternativa, una vez que se aíslan las PBMC, se pueden aislar entre ellas los linfocitos a fin de contar con un cultivo más homogéneo de linfocitos CD8+, y tales linfocitos se cultivan en presencia de una composición de IL-21 antes de readministrárselos al paciente. Puesto que la IL-21 puede aumentar la frecuencia de los linfocitos T hasta niveles que sean lo bastante altos para posibilitar la expansión y la transferencia adoptiva sin requerir ningún otro enriquecimiento de linfocitos T específicos de antígeno, la presente invención da a conocer procedimientos que pueden abreviar enormemente el tiempo necesario hasta recibir el tratamiento y obviar la necesidad de ulterior selección y/o clonación.

La presente descripción proporciona un procedimiento para preparar una población de linfocitos T para el uso como inmunoterapia adoptiva, el cual comprende la identificación de PBMC provistas de un fenotipo histocompatible con un paciente oncológico; el cultivo de material tumoral procedente del paciente junto con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en presencia de una composición de IL-21 y de células presentadoras de antígeno (APC), como son células dendríticas autólogas, monocitos, linfocitos B, estirpes de linfocitos B transformadas por EBV, estirpes de linfocitos B transformadas por EBV y alogénicas que expresen el alelo restringido común, células presentadoras de antígeno artificiales (Yee y col., *Proc Natl Acad Sci.* 99(25):16168. 2002; Oelke y col., *Nat Med.* 9(5):619-24, 2003; Maus y col., *Clin Immunol.* 106(1):16-22.2003; Cai y col., *Immunol Rev.* 165:249-65, 1998); la expansión de tales células en cultivo; y, por último, la reintroducción de las mismas en el paciente. Las PBMC pueden ser autólogas. El material tumoral puede comprender péptidos, ARN total, células tumorales lisadas o cuerpos apoptóticos.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para la preparación de una población de linfocitos T destinada al uso como inmunoterapia adoptiva que comprende la identificación de una población de linfocitos T provistos de un fenotipo histocompatible con un paciente oncológico; el cultivo de material tumoral procedente del paciente junto con la población de linfocitos T en presencia de una composición de IL-21 y de APC; la expansión de esos linfocitos en cultivo, y la reintroducción de los mismos en el paciente. La población de linfocitos T puede ser autóloga (Dudley y col., *Science* 290:850, 2002).

La presente descripción proporciona un procedimiento para la preparación de una población de linfocitos T destinada al uso como inmunoterapia adoptiva que comprende linfocitos T, mielocitos o PBMC (incluidas células NK) genéticamente modificados (mediante transducción vírica, transfección, electroporación u otros procedimientos para introducir material genético) para que expresen un receptor de linfocitos T o un receptor de linfocitos T quimérico fusionado con moléculas de señalización, que reconozca el antígeno diana; el cultivo en presencia de una composición de IL-21; y por último, la expansión de esos linfocitos en cultivo y la reintroducción de los mismos al paciente (Hughes y col., *Hum Gene Ther* 16(4):457, 2005; Roszkowski y col., *Cancer Res* 65(4):1570, 2005; Cooper y col., *Blood* 101: 1637, 2003; Alajez y col., *Blood* 105:4583, 2005). La población de linfocitos T puede ser autóloga.

La presente descripción también proporciona procedimientos para mejorar el tratamiento con vacunas antitumorales. Muchos tumores expresan antígenos extraños que podrían servir como dianas para la destrucción por parte del sistema inmunitario (Boon, T., *Adv. Cancer Res.* 58.177-21 I, 1992). Las vacunas contra el cáncer generan en el paciente una respuesta inmunitaria específica contra el tumor y generalizada que comprende componentes humorales y celulares. La respuesta desencadena el propio sistema inmunitario del paciente tras administrarle una composición vacunal en un punto alejado del tumor o en el punto de un tumor localizado. Los anticuerpos o las células inmunitarias se unen al antígeno tumoral y lisan las células tumorales. Sin embargo, aún existe la necesidad de aumentar la proliferación de las poblaciones de linfocitos T que sean capaces de producir potentes respuestas inmunitarias en condiciones *in vivo*.

Se ha recurrido a numerosos procedimientos para inmunizar a los pacientes con antígenos tumorales; en estos momentos se emplean diversas técnicas para amplificar la potencia de la respuesta inmunitaria tras la administración del antígeno (revisado por Rosenberg, SA. (Ed.), *Principles and practice of the Biologic Therapy of Cancer.*, 3ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000). Los procedimientos con los que se puede usar la IL-21 combinada con una vacuna antitumoral incluyen, entre otros, la administración de células tumorales autólogas y alogénicas que o bien expresan el gen de la IL-21 o en que la IL-21 es liberada en el contexto de una proteína adyuvante. De modo similar, la IL-21 se puede administrar junto con una inyección de proteína antigénica

tumoral purificada, de antígeno tumoral expresado a partir de ADN inyectado, o de péptidos del antígeno tumoral que son presentados a las células efectoras mediante tratamientos a base de células dendríticas. Ejemplos de tales tipos de tratamientos incluyen el uso de citocinas como la IL-2 en el contexto de la vacunación con células tumorales modificadas (Antonia y col., J. Urol. 167:1995-2000, 2002; y Schrayner y col., Clin. Exp. Metastasis 19:43-53, 2002), ADN (Niethammer y col., Cancer Res. 61:6178-84, 2001), y células dendríticas (Shimizu y col., Proc. Nat. Acad. Sci USA 96:2268-73, 1999). La IL-21 se puede usar como un adyuvante para vacunas antitumorales.

La determinación de la eficacia de la vacuna resulta difícil de evaluar. La demostración última de la eficacia es el ritmo de regresión del tumor, la duración de la supervivencia sin enfermedad, o como mínimo, el tiempo hasta la progresión, resultados que exigen el seguimiento del paciente durante años. Para proporcionar medios más inmediatos para evaluar la eficacia se encuentra en marcha una investigación con los denominados "marcadores indirectos" que permitirían hacer mediciones tempranas y predecir el resultado clínico. A día de hoy, las mediciones *in vitro* de las respuestas inmunitarias específicas de la vacuna y/o del tumor no han demostrado ser útiles como marcadores indirectos (véase, Srivastava P., Nat Immunol. 1:363-366, 2000).

En cualquier tratamiento contra el cáncer, cada protocolo puede definir las valoraciones de la respuesta del tumor de un modo distinto, pero se hallarán directrices a modo de ejemplo en el Clinical Research Associates Manual, Southwest Oncology Group, CRAB, Seattle, WA, EE.UU., 6 de octubre de 1998, actualizadas en agosto de 1999. Según el Manual CRA (véase el capítulo 7 "Valoración de la respuesta"), por respuesta del tumor se entiende la reducción o la eliminación de todas las lesiones o metástasis mensurables. La enfermedad se considera en general mensurable si comprende lesiones mensurables bidimensionalmente con márgenes claramente definidos mediante fotografía médica o radiografía, tomografía axial computerizada (TAC), resonancia magnética (RM) o palpación. Enfermedad evaluable significa que la enfermedad comprende lesiones mensurables en una sola dimensión, masas con márgenes difusos, lesión cuyos dos diámetros son inferiores a 0,5 cm, lesiones visibles en las imágenes cuyo diámetro es más pequeño que la distancia entre los cortes, lesiones palpables cuyo diámetro es inferior a 2 cm, o metástasis ósea. Enfermedad no evaluable incluye derrames pleurales, ascitis y enfermedad verificada por evidencias indirectas. Las lesiones previamente irradiadas que no han progresado también se consideran por lo general como no evaluables.

El resultado terapéutico positivo se puede medir con protocolos objetivos del estado para evaluar la respuesta del tumor sólido. Los criterios representativos son los siguientes: (1) Respuesta completa (RC), definida como la desaparición completa de toda la enfermedad mensurable y evaluable sin nuevas lesiones, y sin síntomas relacionados con la enfermedad. Ausencia de indicios de enfermedad no evaluable; (2) Respuesta parcial (RP), definida como un descenso mayor o igual al 30% con respecto al valor inicial en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones mensurables, sin progresión de la enfermedad evaluable ni nuevas lesiones. Según los criterios RESIST, los pacientes con al menos una lesión mensurable; (3) Progresión, definida como un incremento del 20% o de 10 cm² en la suma de los productos de las lesiones mensurables con respecto a la suma más pequeña observada con las mismas técnicas en el momento inicial, o bien un claro empeoramiento de cualquier enfermedad evaluable, o la reaparición de cualquier lesión que hubiera desaparecido, o la aparición de una nueva lesión, o la imposibilidad de que el paciente sea evaluado de nuevo a causa de su muerte o del deterioro de su estado (siempre que la causa no sea ajena al cáncer); (4) Estable o Sin Respuesta, definida como no ser apto para ser calificado como RC, RP ni Progresión. (Véase, Clinical Research Associates Manual, *supra*.)

La invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

A. Líneas celulares y reactivos

Líneas celulares de melanoma A375 (CRL 1619; American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, EE.UU.) y Mel526 (Arrighi y col., Cancer Res. 60 16: 4446-52, 2000; Marcinola et al. J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 19(3):192-205, 1996.) se mantuvieron en RPMI con HEPES (25 mM), L-glutamina (4 mM), penicilina (50 U/ml), estreptomycin (50 mg/ml), piruvato de sodio (10 mM), aminoácidos no esenciales (1 mM), y suero fetal bovino al 10% (Hyclone, Utah, EE.UU.). Ambas estirpes expresan el alelo HLA-A2, pero solo la Mel 526 expresa el antígeno MART-1. La estirpe celular T2 es un híbrido de linfocito T y B deficiente en TAP que expresa el alelo HLA-A2. Las líneas celulares EBV-LCL son líneas celulares linfoblastoides transformadas con el virus de Epstein-Barr (Yee, FHCR, Seattle, WA, EE.UU.).

B. Inducción de los linfocitos T CD8+ humanos específicos de antígeno

Se generaron linfocitos T específicos del péptido M26-35 del melanoma (Yee y col., PNAS 99:16168, 2002; Yee y col., J. Immunol. 162:2227, 1999; Tsai y col., J. Immunol. 158:1796, 1997). La sangre procedente de donantes fue tipada por el laboratorio de tipado del HLA del Puget Sound Blood Center (Seattle, WA, EE.UU.). Primero, los linfocitos T CD8+ se aislaron primero mediante un kit de aislamiento de CD8+.

(Dynabeads, Dynal, Oslo, Noruega) a partir de las PBMC obtenidas por leucofóresis, después se suspendieron en medio para CTL consistente en RPMI1640, HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina (50 U/ml), estreptomycin (50 mg/ml) (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EE.UU.), y suero humano al 10% procedente de donantes normales, depositándose después en placas de cultivo celular de 6 pocillos (Costar, Coming Incorporated, Corning, NY, EE.UU.) a razón de 6×10^6 células/pocillo. Se recolectaron células dendríticas (CD) maduras y se pulsaron con 40 $\mu\text{g/ml}$ de péptidos sintetizados a razón de 2×10^6 células/ml en presencia de 3 $\mu\text{g/ml}$ de $\beta 2$ -microglobulina (Scripps Lab, San Diego, CA, EE.UU.) en PBS con seroalbúmina humana al 1% (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EE.UU.) durante 4 h a temperatura ambiente. Una vez lavadas tres veces con PBS estéril (Life Technologies), las células dendríticas se mezclaron con los linfocitos T CD8 purificados a razón de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Las citocinas, a saber, la IL-15 (10 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), la IL-2 (10 U/ml, Chiron, Emeryville, CA, EE.UU.), la IL-7 (10 ng/ml, R&D Systems), o la IL-21 (30 ng/ml, Zymo Genetics, Seattle, WA, EE.UU.) se añadieron por separado a cada pocillo inmediatamente después de iniciar el cultivo. La IL-2 (50 UI/ml) y la IL-7 (10 ng/ml) se añadieron un día después de la 2ª estimulación para facilitar aún más la expansión de los linfocitos T específicos de antígeno activados.

15 Las células dendríticas se generaron (Bender y col., J. Immunol. Methods 196:121, 1996) exponiendo PBMC adherentes a IL-4 (500U/ml, R&D) y a GM-CSF (800 U/ml, Amgen, Thousand Oaks, CA, EE.UU.) en medio AIM-V® (Life Technologies) seguido por la maduración con IL-1 β 2 ng/ml, IL-6 1000 U/ml, TNF- α 10 ng/ml (R&D Systems) y PGE-2 1 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante dos días más. La población de células dendríticas maduras contenía más del 90% de células CD83+ el octavo día, según se comprobó con el análisis por FACS.

20 C. Tinción de los linfocitos T con anticuerpos más tetrámeros de péptido-MHC

En el laboratorio de control inmunológico del Fred Hutchinson Cancer Center se produjeron tetrámeros de M26-MHC y de G154-MHC marcados con PE o con APC siguiendo protocolos descritos con anterioridad (Altman y col., Science 274:94, 1996). Para el análisis de la muestra, primero se tiñeron $0,5 \times 10^6$ células en 25 μl de SFB al 2%/PBS con tetrámeros de péptidos marcados con PE o con APC (concentración final de 20 μg de MHC/ml) durante una hora a temperatura ambiente, seguidos de la tinción con anticuerpo anti-CD28-APC (BD, PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.) o con anti-CD28-FITC (Caltac Lab, Burlingame, CA, EE.UU.), anti-CCR7-PE y anti-CD45RO o con anti-CD45RA-FITC (BD, PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.) durante 20 min a 4 °C. Después del lavado con PBS, las células se resuspendieron con PBS que contenía SFB al 2% y DAPI. Los datos se adquirieron con el citómetro de flujo FACScalibur y con CellQuest (BD) y se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA, EE.UU.).

D. Enriquecimiento de los subgrupos de linfocitos vírgenes y de memoria

Los linfocitos T se purificaron a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante la aplicación secuencial de una combinación de microperlas magnéticas y un separador magnético Automacs (Miltenyi Biotech, Auburn, California, EE.UU.). Los linfocitos CD8+ se aislaron mediante selección negativa con el kit II de aislamiento de CD8. Después se procedió a la selección de los linfocitos vírgenes (CD8+ CD45RO-CD45RA+ CD62L+) eliminando primero los linfocitos de memoria CD8 con microperlas CD45RO y después seleccionando positivamente los linfocitos CD62L+ mediante una tinción con anticuerpo anti-CD62L conjugado con PE (BD Phamingen, San Diego, CA, EE.UU.) e incubándolos con microperlas anti-PE. El aislamiento de los linfocitos de memoria (CD8+ CD45RA- CD45RO+) se efectuó eliminando la población de linfocitos vírgenes con microperlas CD45RA+. Las purezas típicas evaluadas con FACS superaron el 95%.

E. Clonación y expansión de los CTL específicos de antígeno

Para aislar los linfocitos T se emplearon los procedimientos de clonación y de expansión descritos por Yee, supra, 2002 y Riddell y col., J. Immunolog. Methods 128:189, 1990. Los linfocitos T seleccionados por ser tetrámero+ se sembraron en dilución limitante en placas de 96 pocillos de fondo convexo (Nalge Nunc International, Dinamarca) en presencia de células nodriza irradiadas (PBL y LCL) con un cociente respondedor-estimulador de 1:50.000 junto con anticuerpo monoclonal (AcM) anti-CD3 (OKT3, Ortho Tech, Raritan, NJ, EE.UU.) y 50 U de IL-21/ml en 0,2 ml de medio para CTL. Los pocillos positivos para el crecimiento clonal se detectaron de 10 a 14 días después de la siembra en placa y se cribaron con una prueba de microcitotoxicidad. Los clones específicos del péptido se transfirieron a frascos de 25 cm^2 (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, EE.UU.), se reestimularon con el AcM anti-CD3 y se les añadieron como células nodrizas PBL y LCL alogénicas irradiadas para acelerar la expansión. A los cultivos se les suministró IL-2 a 50 U/ml 24 h después de la reestimulación y a partir de entonces cada 3 días. Al cabo de 14 días, las células se sometieron a nuevos análisis o se crionizaron para conservarlas.

F. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

55 Las células diana (líneas celulares de melanoma 375 y 526 o células T2) se radiomarcaron con 100 μCi de ^{51}Cr y se cultivaron junto con las células efectoras durante 4 h a 37 °C más CO_2 al 5%. En los estudios de ajuste de la dosis del péptido, las T2 se pulsaron con un péptido a concentraciones comprendidas entre 10^1 y 10^7 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora y después se lavaron antes de proceder al radiomarcaje con ^{51}Cr . El ^{51}Cr liberado se midió con un contador de centelleo gamma y se calculó el porcentaje de lisis específica con la fórmula siguiente: Liberación específica

(porcentaje) = liberación experimental–liberación espontánea/liberación total. La liberación espontánea fue < 10% de la liberación total en todos los ensayos.

G. Ensayo de disociación de los complejos de MHC-péptido para identificar los clones de CTL provistos de alta y de baja afinidad

- 5 Los clones de CTL se tiñeron con tetrámeros marcados con APC (20 µg/ml) durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron una vez con PBS frío para eliminar la fracción de tetrámeros que no se había unido. Las células se incubaron en presencia de un exceso (100 µg/ml) de tetrámeros marcados con PE para impedir la reasociación de los tetrámeros marcados con APC tras su disociación de los TCR. Durante este período se recogieron alícuotas de células en diferentes plazos de tiempo y se fijaron con paraformaldehído al 1% para proceder a su análisis por citometría de flujo. La velocidad de disociación de los tetrámeros marcados con APC es inversa a su afinidad por los TCR (Dutoit y col., J. Immunol. 168, 1167, 2002).

Ejemplo 2

La IL-21 aumenta la frecuencia de los linfocitos T CD8+ específicos de antígeno generados tras la estimulación primaria en condiciones *in vitro*

- 15 Se elaboró un sistema modelo para la estimulación primaria en condiciones *in vitro* de los linfocitos T específicos de antígeno consistente en el aislamiento de los linfocitos T CD8+ a partir de las PBMC extraídas a donantes sanos HLA-A2+ y su cultivo junto con células dendríticas maduras y autólogas que fueron pulsadas con epítomos inmunogénicos del autoantígeno asociado a tumor MART-1 (péptido M26-35). A los cultivos no se les añadió ninguna citocina ni IL-21 (Figura 1). La frecuencia de las respuestas de los linfocitos T CD8 específicos de MART-1 en los cultivos se evaluó 7 días después de la estimulación mediante la tinción con tetrámeros. En los donantes sanos representativos (CG, NE y LD), se observó un incremento de entre 16 y 20 veces en la frecuencia de los linfocitos T CD8+ específicos de MART-1 en los cultivos expuestos a la IL-21 con respecto a los cultivos de control sin citocina (0,12% frente a 2,26%; 0,12% frente a 1,95% y 0,11% frente a 2,2%, en ese orden) tras un ciclo de estimulación *in vitro* (Figura 1). Las cifras absolutas de linfocitos T específicos de antígeno generados en los cultivos tratados con la IL-21 superaron en más de 20 a 30 veces a las de los cultivos de control (Tabla 1).

Tabla 1

	CG	NE	LD
Control	0,22 x 10 ⁶	0,30 x 10 ⁶	0,43 x 10 ⁶
IL-21	7,8 x 10 ⁶	8,15 x 10 ⁶	14,1 x 10 ⁶
Aumento (n.º de veces)	35	27	33

El uso de otras citocinas pertenecientes a la familia del receptor de citocinas con cadena gamma común, a saber, las IL-2, IL-7 e IL-15, durante la estimulación primaria *in vitro* no se tradujo en ningún efecto añadido sobre la frecuencia de los linfocitos T CD8+ específicos de MART-1 con respecto a los cultivos de control sin citocinas (Figura 3).

- 30 La adición de la IL-2 y de la IL-7, no obstante, promueve la expansión *ex vivo* de los linfocitos T previamente sensibilizados por su exposición al antígeno, tal y como han demostrado nuestro grupo y otros (Gervois, y col., Clin Cancer Res 6:1459-1467,2000; Liao y col., Mol Ther 9:757-764, 2004). Cuando la IL-2 (10 U/ml) y la IL-7 (10 ng/ml) se añadieron a los cultivos tras la segunda estimulación *in vitro*, aumentaron aún más el volumen de la población de linfocitos T CD8 específicos de MART-1 en los cultivos tratados con la IL-21 (11,8%) con respecto a los cultivos no tratados (2,43%) (Figura 2, donante CG).

- Estos estudios demuestran que la IL-21 tiene la capacidad de potenciar las respuestas de los CTL específicos de antígenos asociados a tumores en los pacientes con melanoma, un tumor que comparte la expresión del MART-1. En un paciente representativo, la frecuencia de los CTL específicos de MART-1 generados en los cultivos tratados con la IL-21 con respecto a los cultivos no tratados que servían como control se multiplicó por 40 tras dos ciclos de estimulación *in vitro* en los primeros con respecto a los segundos (19,1% frente a 0,46%) (Figura 2, paciente ST).

- Para evaluar si el incremento de la frecuencia y de la cifra absoluta de los linfocitos T CD8 específicos de antígeno observado en los cultivos tratados con la IL-21 se debía a la mejora de la proliferación y/o de la supervivencia, se procedió a marcar con CFSE los linfocitos T CD8 vírgenes y a estimularlos después *in vitro* con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido MART-1 y, en el séptimo día, se evaluó la fracción de linfocitos que se hallaban en división (calculada mediante los acusados descensos de la tinción con CFSE que acompañan a cada división celular) y en apoptosis (tinción con anexina V). En el caso de la tinción con CFSE, los análisis efectuados con la población de linfocitos T tetrámero-positivos (específicos de MART-1) demuestran una fracción sustancialmente mayor de células quiescentes (recuadro derecho) en los cultivos no tratados (44%) que en los tratados con la IL-21 (18%) (Figura 4). De hecho, el cociente de los linfocitos T específicos de antígeno que se hallaban en rápida división (recuadro izquierdo) con respecto a los que se hallaban en quiescencia es más de 3 veces mayor en los cultivos tratados con la IL-21 que en los cultivos no tratados (63 : 18% frente a 36 : 44%). Que el efecto de la IL-21 sobre la proliferación de los linfocitos T es específico del antígeno queda demostrado por la gran fracción de linfocitos T tetrámero-negativos (no específicos de antígeno) que permanecieron en la fase de quiescencia (95,6% y 87,9%).

La tinción con anexina V de los linfocitos T tetrámero-positivos en el día 7 revela un pequeño descenso de la fracción de los linfocitos T específicos de antígeno en apoptosis (anexina V+) en los cultivos tratados con la IL-21 con respecto a los cultivos no tratados (10,4% frente a 5,4% de linfocitos T tetrámero+, respectivamente, Figura 2). En conjunto, tales resultados indican que el incremento de la frecuencia y de las cifras absolutas de los linfocitos T CD8 específicos de antígeno generado en los cultivos tratados con la IL-21 obedeció principalmente a la potenciación de la proliferación de las células específicas de antígeno y, en menor medida, a la mayor supervivencia o menor apoptosis de las mismas.

Ejemplo 3

La IL-21 potencia la respuesta de los linfocitos T específicos de antígeno en la población de CTL predominantemente vírgenes.

La capacidad de la IL-21 para potenciar la generación de los linfocitos T CD8+ específicos de antígeno se evaluó por separado en los linfocitos T vírgenes y en los de memoria. Las poblaciones purificadas de linfocitos T CD8+ vírgenes (> 98% CD45RA+, CD62L+) se compararon con las de los linfocitos T CD8+ de memoria (100% CD45RO+) procedentes tanto de un donante normal sano (CG) (Figura 5) como de un individuo con melanoma metastásico (ST). Si bien la IL-21 ejerce un efecto mínimo sobre la frecuencia de los linfocitos específicos de MART-1 generados a partir de los linfocitos T CD8+ de memoria (0,10% a 0,15% y 0,05% a 0,037%), sí se observó un incremento de 12 a 90 veces en la de los linfocitos T CD8+ vírgenes tras la exposición a la IL-21 (0,94% a 12,5% y 0,08% a 7,08%), lo cual prueba que la IL-21 influye principalmente en los linfocitos T vírgenes.

Ejemplo 4

Los CTL generados en los cultivos tratados con la IL-21 constituyen una población de linfocitos T específicos de antígeno y alta afinidad provista de una reactividad potenciada contra el tumor

Para caracterizar mejor la función de las poblaciones de linfocitos T específicas de antígeno generadas bajo la influencia de la IL-21 a nivel clonal, el séptimo día se seleccionaron linfocitos T CD8+ tetrámero+ procedentes de un donante sano (CG) y de un paciente con melanoma (ST) y se procedió a clonarlos a una dilución limitante en placas de 96 pocillos. Los clones específicos de MART-1 identificados en los ensayos de microcitotoxicidad se expandieron y se analizaron para determinar: 1) La concentración de péptido necesaria para lograr un 50% de la lisis máxima (P_{50}) de las células T2 pulsadas con el péptido; y 2) La capacidad para lisar las dianas del melanoma portadoras del antígeno. Para evaluar la P_{50} , la estirpe de linfocitos B transfectados por EBV con el HLA-A2, T2, se titularon con concentraciones del péptido comprendidas entre 10^7 y 10^2 pM. Los resultados se presentan en forma de la dosis necesaria de péptido (nM) para lograr el 50% de lisis (P_{50}). Los clones de CTL generados a partir de los cultivos tratados con la IL-21 precisaron una dosis de péptido > 1 log inferior que sus contrapartidas no tratados: media de 3 nM (intervalo 0,6 a 30 nM) de los primeros en comparación con una media de 80 nM de los segundos (intervalo 16 a 500 nM) (Figura 6 A). En los clones de CTL generados a partir del paciente con melanoma (ST) se observó un efecto similar de la IL-21 (Figura 6B).

A una razón de 10:1 entre la célula efectora y su diana (E:T; por sus iniciales en inglés *Effector/Target*), los clones de linfocitos T aislados tras la estimulación en presencia de la IL-21 mostraron una actividad lítica específica mucho mayor contra la estirpe de células de melanoma 526 positiva para MART-1 (35%-45%) que los aislados sin la presencia de la IL-21 (Figuras 6C y 6D). En todos los clones individuales estudiados, la reactividad antitumoral potenciada coincidió con el descenso de la dosis necesaria de péptido, lo cual indica que los CTL generados en presencia de la IL-21 mostraron una mayor avidéz hacia su diana afín.

Puede demostrarse que la avidéz potenciada hacia el tumor es atribuible a la mayor afinidad del TCR y no a otros factores accesorios con ensayos de tinción de los TCR con tetrámeros. Si bien la intensidad de la tinción con tetrámeros en general se puede correlacionar con la afinidad del TCR (Yee y col., J. Immunol. 162:2227, 1999; Crawford y col., Immunity 8:675, 1998), es posible obtener una definición más precisa de dicha afinidad recurriendo a la velocidad de disociación de los tetrámeros, K_d , con respecto a su ligando TCR específico (Dutoit y col., J. Immunol. 168:675, 1990). En dicho ensayo, la K_d de la interacción entre el MHC-péptido y el TCR o afinidad del TCR es inversa a la fracción de tetrámeros unidos que permanece así con el tiempo en presencia de un exceso de tetrámeros sin marcar. Los clones de CTL activados en los cultivos tratados y no tratados con la IL-21 se tiñeron con tetrámeros con el péptido M27 conjugados con PE y se incubaron con un exceso de tetrámero-M27 sin marcar. La fracción de CTL que reconocieron los tetrámeros y se unieron a ellos se determinó por citometría de flujo en intervalos de tiempo predefinidos (2 a 60 minutos). Las constantes de disociación (*off-rates*) de los complejos de TCR/tetrámero-péptido resultaron ser sustancialmente más rápidas en los clones aislados de los cultivos no tratados que en los clones derivados de los cultivos tratados con la IL-21 (Fig. 7). En conjunto, tales resultados demuestran que el tratamiento con la IL-21 propicia la generación de clones de linfocitos T que expresan TCR de alta afinidad.

A fin de demostrar si el enriquecimiento de linfocitos T de alta afinidad mediado por la IL-21 se debía a una expansión oligoclonal de un escaso número de linfocitos T específicos de antígeno o representaba un efecto más amplio sobre el repertorio de linfocitos T, se examinó la expresión de la cadena V beta del TCR en las cohortes de clones de linfocitos T de alta y de baja afinidad con un conjunto de anticuerpos anti-V beta. Por ejemplo, en el caso

del paciente CG, de los nueve clones de linfocitos T con alta afinidad, siete expresaron cadenas V beta únicas (solo dos compartieron la expresión de V beta comunes), y en el grupo de los clones de linfocitos T con baja afinidad de este paciente se observó un repertorio de TCR similarmente diverso (entre diez clones distintos con baja afinidad, solo dos compartían la misma V beta) lo cual parece indicar que el efecto de la IL-21 no obedeció meramente a la expansión de una población oligoclonal de clones de linfocitos T con alta afinidad en condiciones *in vitro* (Figura 3).

Ejemplo 5

El cultivo de linfocitos T CD8 específicos de antígeno con la IL-21 mantiene la expresión del CD28 y la producción de IL-2 y de IFN- γ

El CD28 es una molécula coestimuladora importante tanto para el desencadenamiento de la respuesta de los linfocitos T CD4 como de los CD8. La señalización a través del receptor CD28 refuerza la estabilidad del ARNm de la IL-2 y potencia la producción de esta interleucina, tanto en los linfocitos T CD4 como en los CD8 (Boise et al, *Immunity* 3:87-98, 1995; Ragheb et al, *J. Immunol.* 163:120-129, 1999). La expresión del CD28 se pierde en un subgrupo de linfocitos T CD8+ humanos tras su activación y este subgrupo exhibe una proliferación reducida tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3 (Azuma et al, *J. Immunol.* 150:1147-1159, 1993). Los linfocitos T CD28-CD8+ son más numerosos en las personas ancianas y en el acervo de linfocitos T de memoria CD8 en las personas que sufren infecciones víricas persistentes, como las causadas por el EBV y los CMV (Posnett et al, *Int. Immunol.* 11:229-241, 1999). La pérdida de la expresión del CD28 es más pronunciada en los pacientes con VIH (Appay et al, *Nat. Med.* 8:379-385, 2002) y se han descrito incrementos de dicha población en los pacientes con melanoma. En fecha reciente, se ha mostrado que la restauración de la expresión del CD28 en linfocitos T CD8 específicos contra los CMV mantiene la producción de la IL-2 y prolonga la supervivencia de los linfocitos T CD8 específicos de antígeno en condiciones *in vitro* (Topp et al, *J. Exp. Med.* 198:947-955, 2005). Esta vía es reconocida por tanto como importante para prolongar la supervivencia y la función de los CD8.

Los CTL que reconocen el autoantígeno MART-1 se hallan en escaso número en la sangre periférica de los donantes sanos y normalmente se caracterizan por tener un fenotipo virgen (CD45RA+, CCR7+ y CD28^{hi}). Se ha examinado la diferenciación de esta escasa población en presencia de la IL-21. Linfocitos no tratados pero estimulados con el antígeno mostraron un fenotipo CD45RO+ acompañado por la pérdida de la expresión del CCR7 y del CD28 al cabo de una semana de cultivo. En contraste, los cultivos tratados con la IL-21 mostraron niveles sostenidos de expresión del CD28, aun cuatro semanas después de la estimulación primaria con el antígeno (Figura 10). Esta regulación al alza del CD28 se observó tanto en los donantes sanos no expuestos como en los pacientes con melanoma tanto en los CTL específicos para MART-1 como en los específicos para la gp-100.

Para valorar si la expresión al alza del CD28 propició una señal funcionalmente competente, en dichos cultivos se analizó la producción de IL-2 y de IFN- γ activada por el antígeno. Tal y como se aprecia en la Figura 11, la producción de la IL-2 aumentó sustancialmente en los linfocitos CD28^{hi} tratados con la IL-21 en comparación con los linfocitos que expresaban CD28^{lo} y que no fueron tratados. Asimismo, la producción de IL-2 resultó inhibida por la adición de CTLA-4lg, lo cual indica que la expresión del CD28 fue esencial para la producción de la IL-2 en dichos linfocitos.

Estos datos indican que, en condiciones *in vitro*, la IL-21 es capaz de inducir una población de linfocitos T CD8 de memoria que expresan el CD28 y que son capaces de producir la IL-2. Esto se podría traducir en una mayor supervivencia y activación de dichos linfocitos T CD8 en condiciones *in vitro* e *in vivo* y apunta a un importante papel del tratamiento con IL-21 como monoterapia y en la terapia con células adoptivas contra el cáncer y las infecciones víricas.

Ejemplo 6

La IL-21 influye en la respuesta de los linfocitos T CD8 frente a los antígenos gp100 y NY-ESO-1

Para demostrar que los linfocitos T reconocen otros autoantígenos, se evaluó de forma similar la influencia de la IL-21 sobre los linfocitos T CD8+ usando otros dos autoantígenos asociados a tumores: el antígeno del melanosoma gp100 (péptido G154) y el antígeno de cáncer-testículo NY-ESO-1 (NY157). Véase Li y col., *J. Immunol.* 175:2261-2269. 2005.

A los linfocitos T CD8+ se los estimuló en condiciones *in vitro* con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido NY-ESO-1 (NY157) o con el gp100 (G154). A los cultivos destinados a ser tratados con la IL-21 se les añadió esta citocina (30 ng/ml). Seis días después de la estimulación primaria *in vitro* se analizaron los cultivos para determinar la especificidad antigénica y el fenotipo de la superficie mediante la tinción con tetrámeros y el análisis multiparamétrico con citometría de flujo.

En el recuadro A de la Figura 13, las frecuencias de los CTL específicos del NY157 y del G154 se exponen en forma de porcentaje con respecto al total de linfocitos T CD8+ junto a las ventanas de análisis (*gates*) enmarcadas. Por ejemplo, el incremento de los CTL específicos del NY-ESO-1 fue 9,8 veces mayor en los linfocitos tratados con la IL-21 que en los linfocitos control (5,3%:0,54%). Se calculó el incremento de la cifra absoluta de CTL específicos del NY-ESO-1 a partir del número de células en los respectivos cultivos y, en el caso del NY-ESO-1, se comprobó que

los linfocitos que habían sido tratados con la IL-21 eran casi 20 veces más numerosos.

En el recuadro B de la Figura 13, se expone el análisis de la expresión del CD28 en los linfocitos tetrámero+ seleccionados procedentes de los cultivos tratados con la IL-21 y de los cultivos de control. (Todos los linfocitos eran CD45RO+ y CCR7-negativos). El análisis por histogramas de la expresión del CD28 en los CTL específicos del NY-OEST-1 y del gp1000 mostró que esta aparecía notablemente regulada al alza en los cultivos tratados con la IL-21 con respecto a los controles. Estos resultados son representativos de 6 experimentos independientes efectuados con 3 individuos que eran HLA-A2+.

Ejemplo 7

Potenciación de la inmunidad antitumoral en los pacientes con melanoma que reciben el tratamiento con la IL-21 después de haber sido sometidos a un tratamiento mielodepresor y a la transferencia de las células adoptivas

La terapia con células adoptivas (TCA) se basa en la selección en condiciones *ex vivo* de los linfocitos que reaccionan contra el tumor y en su activación en el hospedador portador del tumor autólogo. Los linfocitos T específicos de tumor (TIL) se activan y se expanden *in vitro* en presencia de los propios antígenos tumorales del paciente con la concurrencia de citocinas, y después se transfieren a dicho paciente que seguirá recibiendo un tratamiento de mantenimiento con citocinas. En un número sustancial de pacientes, ello provoca el alza del número de linfocitos T específicos de antígeno en la periferia resultando en efectos antitumorales, tal y como se evidencia a través de respuestas antitumorales objetivas. La IL-21 se emplea como activador/expansor *in vitro* de los linfocitos T específicos de antígeno y también como tratamiento de mantenimiento para los linfocitos T una vez que estos se transfieren a los pacientes con cáncer.

Todos los estudios con pacientes humanos cuentan con la aprobación del comité de ética de investigación clínica del hospital donde se efectuaron los ensayos clínicos. Tras otorgar el consentimiento informado, se obtienen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se generan los linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno (CTL) mediante el uso de células dendríticas pulsadas con el epítipo peptídico restringido a A2 de MART-1 (M27) o el de gp100 (G154) o por medio de un lisado de células tumorales extraídas por biopsia del tumor del paciente. Los linfocitos T se expanden en un reactor aprobado para las BPF con las citocinas oportunas (25-50 ng/ml de IL-2 o 10-50 ng/ml de rIL-21). En ciertos casos, al cabo de tres ciclos de estimulación a intervalos semanales, los linfocitos T se clonan y se expanden para proceder a su análisis *in vitro*. Se seleccionan los clones de CTL que demuestran lisar de forma específica las dianas tumorales portadoras del antígeno en cuestión en el ensayo de liberación de cromo. Los clones se expanden en ciclos de 14 días mediante la adición de un anticuerpo anti-CD3 (OKT3, Orthoclone; Ortho Biotech, Raritan, NJ, EE.UU.) a razón de 30 ng/ml, con PBMC alogénicas irradiadas, 10^6 células/ml, líneas celulares linfoblastoides alogénicas irradiadas (2×10^5 células/ml), e IL-2 en serie (aldesleukin; Chiron) a razón de 25-50 unidades/ml cada 2 o 3 días. Todos los clones se caracterizan como CD3+, CD4- y CD8+, y expresan el receptor de la IL-2 de alta afinidad (CD25) tras la estimulación con antígeno.

A los pacientes con melanoma metastásico en estadio III-IV se les somete a quimioterapia sin mielodepresión, consistente en 2 días con ciclofosfamida (60 mg/kg) seguidos de 5 días con fludarabina (25 mg/m²). El día siguiente de recibir la última dosis de fludarabina, los pacientes reciben la infusión de linfocitos oncorreactivos (10^6 - 10^{10} células/infusión) y el tratamiento con citocinas (dosis alta de IL-2 720.000 UI/kg por vía i.v. cada 8 horas o 10-30 µg/kg de rIL-21 en diversas pautas posológicas). A algunos pacientes se les vacuna con 1 mg de péptido MART-1:26-35 (27L) o de péptido gp100:209-217 (210M) acompañado del adyuvante incompleto de Freund (IFA) a través de una inyección subcutánea. Los parámetros hematológicos de los pacientes se controlan a diario. El resultado terapéutico positivo se puede medir con protocolos objetivos del estado para evaluar la respuesta del tumor sólido. La respuesta del paciente se evalúa con estudios radiológicos ordinarios y exploración física. Véase, Clinical Research Associates Manual, Southwest Oncology Group, CRAB, Seattle, WA, EE.UU., 6 de octubre de 1998, actualizado en agosto de 1999.

La presencia de respuesta RC y/o RP objetiva en este ensayo parece indicar el importante papel de la IL-21 en las respuestas antitumorales en el contexto de la terapia con células adoptivas mediante el cultivo de linfocitos *in vitro* junto con la IL-21 o el mantenimiento de los pacientes con la IL-21 tras haber recibido la terapia con células adoptivas (TCA).

Ejemplo 8

El cultivo *in vitro* junto con la IL-21 potencia los efectos antitumorales en un modelo de TCA en ratón

Los ratones transgénicos Pmel-1 han sido genéticamente modificados para expresar un receptor de linfocito T (TCR) que es específico del antígeno peptídico específico del melanoma humano gp100₂₅₋₃₃ (Overwijk y col., J. Exp. Med. 198:569-580. 2003). Los esplenocitos de los ratones transgénicos pmel-1 se aíslan y se cultivan durante 6 o 7 días en presencia del péptido humano gp100₂₅₋₃₃ en concentración 1 µM; los medios de cultivo contienen 30 UI/ml de IL-2 humana recombinante o 10-100 ng/ml de IL-21 de ratón.

A ratones hembra C57B116 (6 a 12 semanas de vida, Charles River Laboratories) se les inyectan por vía s.c. 2×10^5 células de melanoma B16-F10 y entre 10 a 14 días después reciben una transferencia adoptiva de

5 esplenocitos pmel-1 cultivados *in vitro* por vía i.v. (tal y como se ha especificado antes). El día de la transferencia se somete a los ratones portadores del tumor a la irradiación total del cuerpo con una dosis subletal (5 Gy) para provocar una linfopenia. A continuación, a los ratones se los vacuna con 2×10^5 ufp de poxvirus aviar recombinante que expresa la gp100 humana y después se les trata con citocinas (rhIL-2, 100 µg/dosis y 6 a 15 dosis) o son tratados únicamente con citocinas (sin vacuna). Los tumores se miden con calibres y su volumen se calcula con la fórmula: volumen del tumor = $1/2 (B^2 \times L)$, en que B es el diámetro menor del tumor y L su diámetro mayor.

La reducción del crecimiento tumoral cuando se transfieren células pmel que han sido cultivadas con la IL-21 demuestra el importante cometido de la IL-21 en la activación y la expansión *in vitro* de los linfocitos T específicos de antígeno para la terapia con células adoptivas.

10 **Ejemplo 9**

El tratamiento *in vivo* con la IL-21 potencia los efectos antitumorales en un modelo de de terapia celular adoptiva en ratón

15 Los ratones transgénicos Pmel-1 han sido genéticamente modificados para expresar un receptor de linfocito T (TCR) específico del antígeno peptídico específico del melanoma humano gp100₂₅₋₃₃ (Klebanoff y col., PNAS 101: 1969-1974, 2004). Los esplenocitos de los ratones transgénicos pmel-1 se aíslan y se cultivan durante 6 o 7 días en presencia del péptido humano gp100₂₅₋₃₃ en una concentración de 1 µM; los medios de cultivo contienen 30 UI/ml de IL-2 humana recombinante o 10-100 ng/ml de IL-21 de ratón.

20 A ratones hembra C57B116 (6 a 12 semanas de vida, Charles River Laboratories) se les inyectan por vía s.c. $2-5 \times 10^5$ células de melanoma B16-F10 y entre 10 a 14 días después reciben una transferencia adoptiva de esplenocitos pmel-1 cultivados *in vitro* por vía i.v. (tal y como se ha especificado antes). El día de la transferencia se somete a los ratones portadores del tumor a la irradiación total del cuerpo con una dosis subletal (5 Gy) para provocar una linfopenia. A continuación, a los ratones se los vacuna con 2×10^5 ufp de poxvirus aviar recombinante que expresan la gp100 humana y después se les trata con citocinas (rhIL-2, 100 µg/dosis, 6 a 15 dosis) o son tratados únicamente con citocinas (sin vacuna). Los tumores se miden con calibres y su volumen se calcula con la fórmula: volumen del tumor = $1/2 (B^2 \times L)$, en que B es el diámetro menor del tumor y L su diámetro mayor.

25 La reducción del crecimiento tumoral tras el tratamiento con la IL-21 en condiciones *in vivo* demuestra el cometido de la IL-21 en el mantenimiento y la activación de los linfocitos T específicos de tumor tras la terapia con células adoptivas.

LISTADO DE SECUENCIAS

30

<110> ZymoGenetics, Inc. Yee, Cassian

<120> MÉTODOS PARA EL USO DE LA IL-21 EN LA INMUNOTERAPIA ADOPTIVA Y LA IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES

35

<130> 04-15PC

<150> US 60/630.727

<151> 24-11-2004

40

<160> 2

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

45

<210> 1

<211> 642

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50

<220>

<221> CDS

<222> (47)...(532)

55

<400> 1

ES 2 601 896 T3

```

gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtactt atg aga tcc      55
                                     Met Arg Ser
                                     1

agt cct ggc aac atg gag agg att gtc atc tgt ctg atg gtc atc ttc      103
Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met Val Ile Phe
   5                               10                               15

ttg ggg aca ctg gtc cac aaa tca agc tcc caa ggt caa gat cgc cac      151
Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln Asp Arg His
  20                               25                               30                               35

atg att aga atg cgt caa ctt ata gat att gtt gat cag ctg aaa aat      199
Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn
                               40                               45                               50

tat gtg aat gac ttg gtc cct gaa ttt ctg cca gct cca gaa gat gta      247
Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val
                               55                               60                               65

gag aca aac tgt gag tgg tca gct ttt tcc tgt ttt cag aag gcc caa      295
Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln
   70                               75                               80

cta aag tca gca aat aca gga aac aat gaa agg ata atc aat gta tca      343
Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile Asn Val Ser
   85                               90                               95

att aaa aag ctg aag agg aaa cca cct tcc aca aat gca ggg aga aga      391
Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala Gly Arg Arg
  100                               105                               110                               115

cag aaa cac aga cta aca tgc cct tca tgt gat tct tat gag aaa aaa      439
Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys
                               120                               125                               130

cca ccc aaa gaa ttc cta gaa aga ttc aaa tca ctt ctc caa aag atg      487
Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met
                               135                               140                               145

att cat cag cat ctg tcc tct aga aca cac gga agt gaa gat tcc      532
Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser
   150                               155                               160

tgaggatcta acttgcagtt ggacactatg ttacatactc taatatagta gtgaaagtca 592
tttcttttgta ttccaagtgg aggagcccta ttaaattata taaagaaata      642

```

<210> 2
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

5

10

ES 2 601 896 T3

Met	Arg	Ser	Ser	Pro	Gly	Asn	Met	Glu	Arg	Ile	Val	Ile	Cys	Leu	Met
1				5					10					15	
Val	Ile	Phe	Leu	Gly	Thr	Leu	Val	His	Lys	Ser	Ser	Ser	Gln	Gly	Gln
			20					25					30		
Asp	Arg	His	Met	Ile	Arg	Met	Arg	Gln	Leu	Ile	Asp	Ile	Val	Asp	Gln
		35					40					45			
Leu	Lys	Asn	Tyr	Val	Asn	Asp	Leu	Val	Pro	Glu	Phe	Leu	Pro	Ala	Pro
	50					55					60				
Glu	Asp	Val	Glu	Thr	Asn	Cys	Glu	Trp	Ser	Ala	Phe	Ser	Cys	Phe	Gln
65					70					75					80
Lys	Ala	Gln	Leu	Lys	Ser	Ala	Asn	Thr	Gly	Asn	Asn	Glu	Arg	Ile	Ile
				85					90					95	
Asn	Val	Ser	Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Pro	Pro	Ser	Thr	Asn	Ala
			100					105					110		
Gly	Arg	Arg	Gln	Lys	His	Arg	Leu	Thr	Cys	Pro	Ser	Cys	Asp	Ser	Tyr
	115						120					125			
Glu	Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Leu
	130					135					140				
Gln	Lys	Met	Ile	His	Gln	His	Leu	Ser	Ser	Arg	Thr	His	Gly	Ser	Glu
145					150					155					160
Asp	Ser														

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de identificación de un antígeno tumoral que comprende:
 - 5 el cultivo simultáneo de material tumoral aislado de un paciente junto con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en presencia de una composición de IL-21 y de células presentadoras de antígeno (APC);
 - el aislamiento de una población de linfocitos T CD8+ del cultivo, en la cual el número producido de linfocitos T específicos de antígeno tumoral es más de 20 a 30 veces mayor que el número de linfocitos T específicos de antígeno tumoral producidos sin la presencia de la IL-21;
 - la clonación de linfocitos T CD8+ individuales a partir de la población de linfocitos T CD8+; y
 - 10 la identificación del antígeno mediante la caracterización de los clones de linfocitos T por su especificidad antigénica.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la población de linfocitos T CD8+ es CD28+ y capaz de producir la IL-2.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la población de linfocitos T CD8+ es una población de linfocitos T CD8+ que no están terminalmente diferenciados.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las PBMC o la población de linfocitos T CD8+ es una población de células autólogas.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el material tumoral comprende ARN total, células tumorales lisadas o cuerpos apoptóticos.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cultivo simultáneo tiene lugar en presencia de la composición de IL-21 y de una o varias citocinas adicionales.
7. Procedimiento de preparación de una población de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral para el uso en la inmunoterapia adoptiva, el cual comprende:
 - 25 el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de una muestra biológica, en el que dichas PBMC comprenden una población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes;
 - la identificación de PBMC provistas de un fenotipo que sea histocompatible con un sujeto que padece un tumor;
 - el aislamiento de una población de linfocitos T CD8+ humanos vírgenes entre dichas PBMC histocompatibles;
 - el cultivo simultáneo del material tumoral aislado del sujeto junto con la población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes en presencia de una composición de IL-21 y de células presentadoras de antígeno (APC), en el que dicho material tumoral comprende un antígeno tumoral; y
 - 30 la expansión de las células en cultivo, en el que el número producido de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígenos tumorales es más de 20 a 30 veces mayor que el número de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral producidos sin la presencia de la IL-21.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la población de linfocitos T humanos CD8+ específicos del antígeno tumoral es CD28+ y capaz de producir la IL-2.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que las PBMC son autólogas.
10. Procedimiento de preparación de una población de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral para el uso en la inmunoterapia adoptiva, que comprende:
 - 40 la identificación, a partir de una muestra biológica humana aislada que contiene linfocitos T, de una población de linfocitos T humanos provistos de un fenotipo que sea histocompatible con un sujeto afectado por un tumor;
 - el aislamiento de una población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes a partir de dicha población de linfocitos T humanos histocompatibles;
 - el cultivo simultáneo del material tumoral aislado del sujeto junto con la población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes en presencia de una composición de IL-21 y de APC, en el que dicho material tumoral comprende un antígeno tumoral; y
 - 45 la expansión de estas células en cultivo, en el que el número producido de linfocitos T humanos CD8+ específicos de los antígenos tumorales es más de 20 a 30 veces mayor que el número de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral producidos sin la presencia de la IL-21.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la población de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral es CD28+ y capaz de producir la IL-2.
- 50 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la población de linfocitos T CD8+ es autóloga.
13. El procedimiento de las reivindicaciones 7 o 10, en el que el material tumoral comprende ARN total, células tumorales lisadas o cuerpos apoptóticos.

14. Procedimiento de expansión en condiciones *ex vivo* de linfocitos T CD8+ citotóxicos humanos y específicos de antígeno tumoral, el cual comprende:

la identificación, a partir de una muestra biológica humana aislada que contiene linfocitos T, de una población de linfocitos T humanos provistos de un fenotipo que sea histocompatible con un sujeto;

5 el aislamiento de una población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes a partir de dicha población de linfocitos T humanos histocompatibles;

el cultivo simultáneo del material tumoral aislado del sujeto junto con la población de linfocitos T humanos CD8+ vírgenes en presencia de una composición de IL-21, en el que dicho material tumoral comprende un antígeno tumoral; y

10 la expansión de las células en cultivo, en el que el número producido de linfocitos T CD8+ citotóxicos humanos específicos de antígeno tumoral es más de 20 a 30 veces mayor que el número de linfocitos T CD8+ citotóxicos humanos específicos de antígeno tumoral producidos sin la presencia de la IL-21.

15 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la población de linfocitos T CD8+ citotóxicos humanos es CD28+ y capaz de producir la IL-2.

16 16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 7, 10 o 14, en el que tras la etapa de cultivo simultáneo del material tumoral junto con la población de linfocitos T CD8+ vírgenes humanos, se enriquecen los linfocitos T CD8+ citotóxicos humanos.

17. El uso de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral y expandidos para la fabricación de un medicamento destinado a inmunoterapia adoptiva para un sujeto afectado por un tumor, en el que los linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral poseen un fenotipo que es histocompatible con el sujeto, y en el que los linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral han sido cultivados simultáneamente junto con material tumoral del sujeto en presencia de IL-21 y de APC, y en el que los linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral son CD28+ y capaces de producir la IL-2, y en el que dicha población de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral productores de IL-2 y CD28+ se cultiva sin la presencia de otras citocinas adicionales con lo que se expanden dichos linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral.

18. Linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral, productores de IL-2, CD28+ y expandidos, preparados mediante el cultivo simultáneo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provistas de un fenotipo que es histocompatible con un sujeto junto con material tumoral aislado del sujeto, en presencia de IL-21 y de APC, a fin de producir una población de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral que es CD28+ y capaz de producir la IL-2, y que se expanden en cultivo sin la presencia de citocinas adicionales, para el uso como inmunoterapia adoptiva para el sujeto afectado por el tumor.

19. Linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral y expandidos para el uso como inmunoterapia adoptiva para un paciente afectado por un tumor, en el que dichos linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral poseen un fenotipo que es histocompatible con el sujeto, y en el que los linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral han sido cultivados simultáneamente junto con material tumoral del sujeto en presencia de IL-21 y de APC, y en el que los linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral son CD28+ y capaces de producir la IL-2, y en que dicha población de linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral, productores de IL-2 y CD28+ se cultiva sin la presencia de otras citocinas con lo que se expanden dichos linfocitos T humanos CD8+ específicos de antígeno tumoral.

40

Figura 1

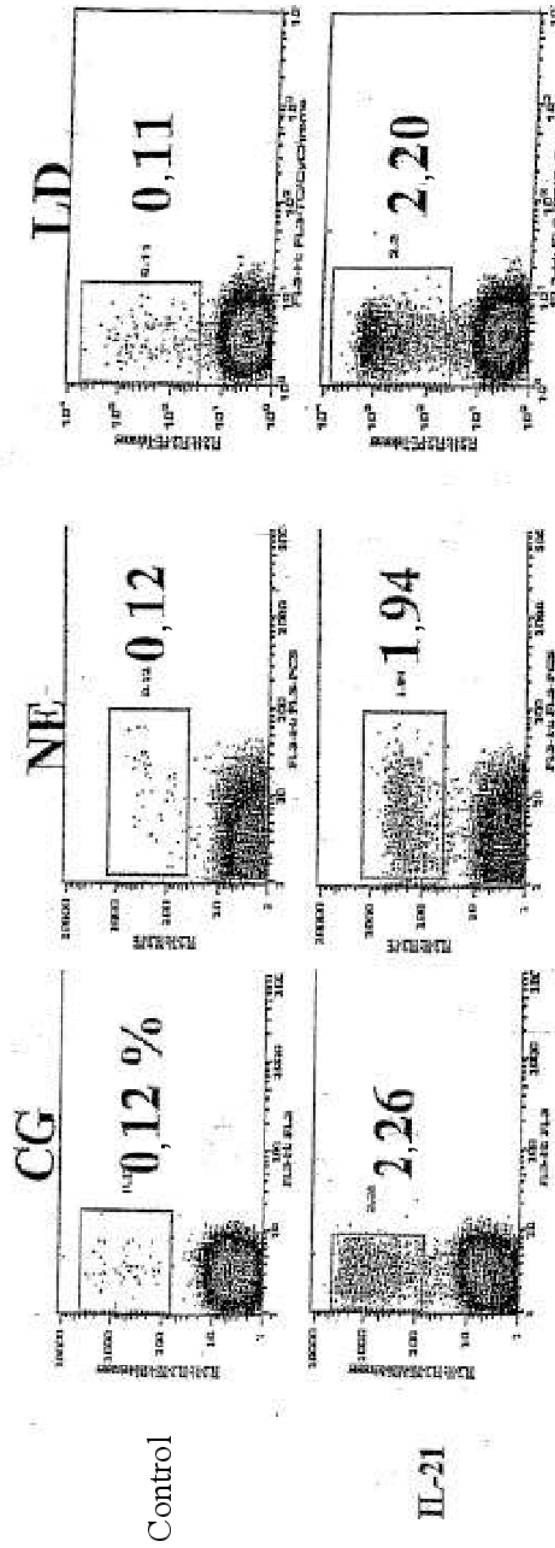


Figura 2

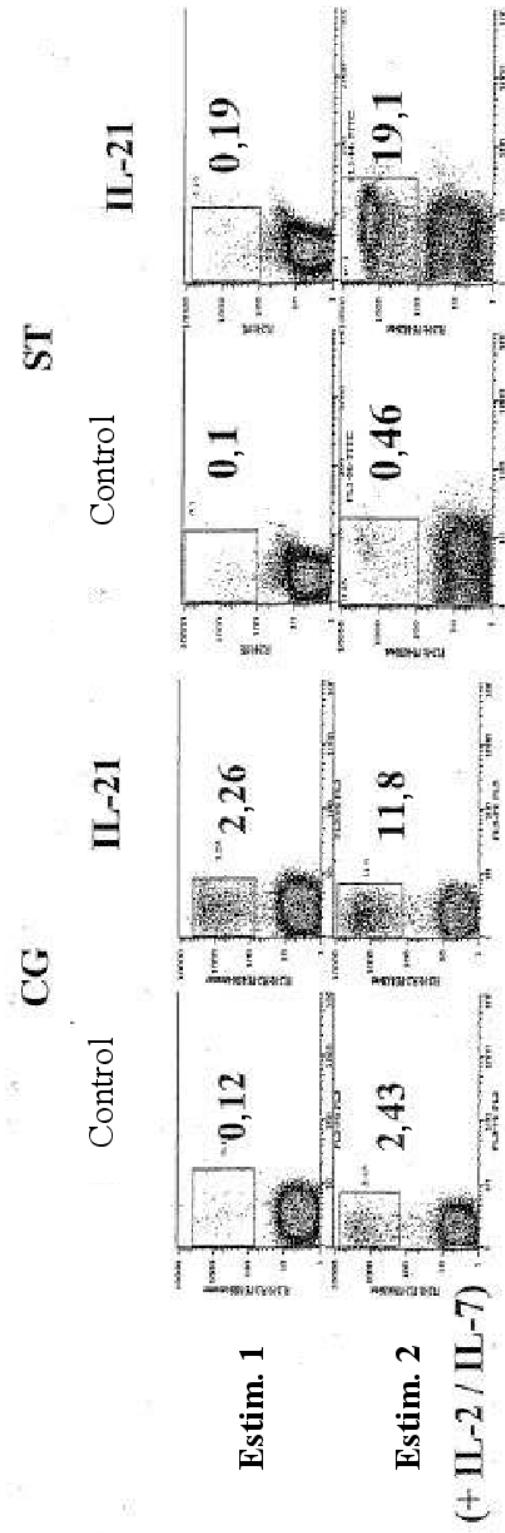


Figura 3

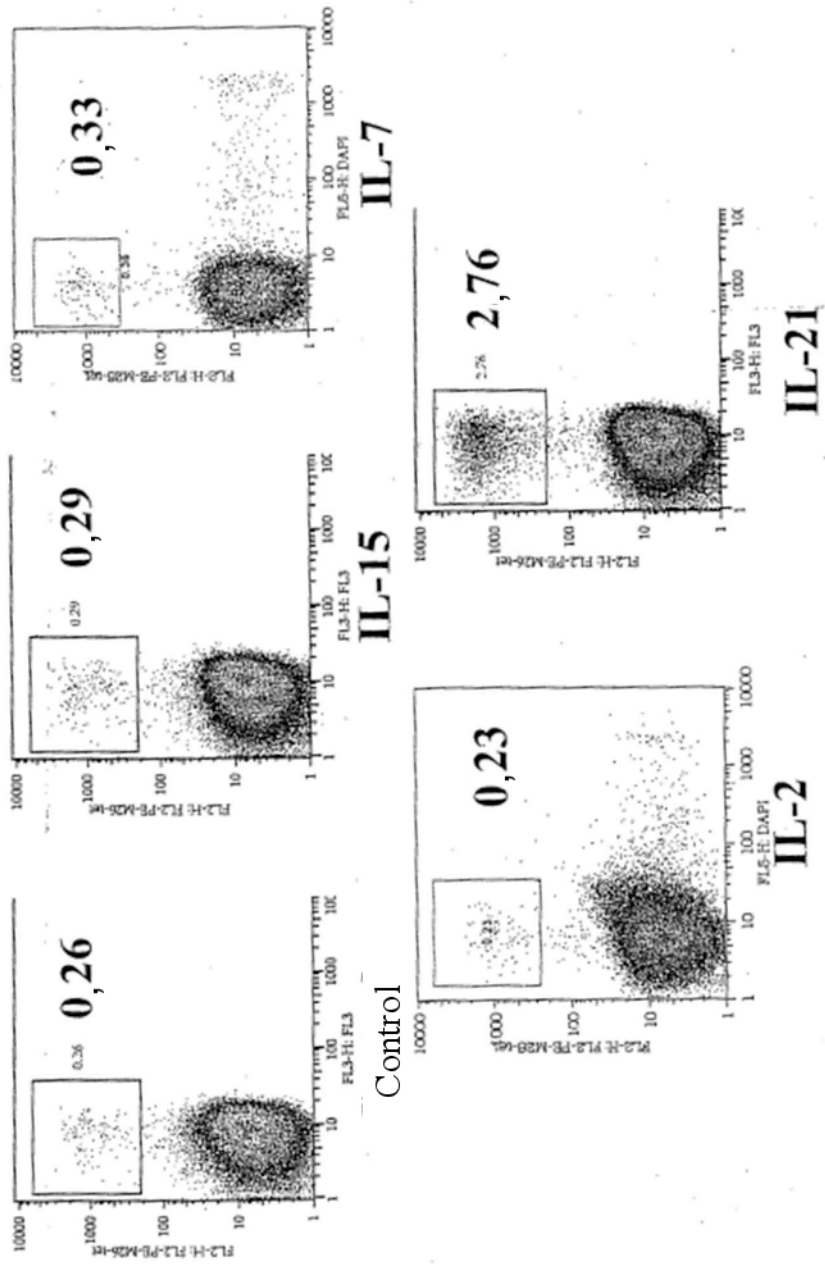


Figura 4

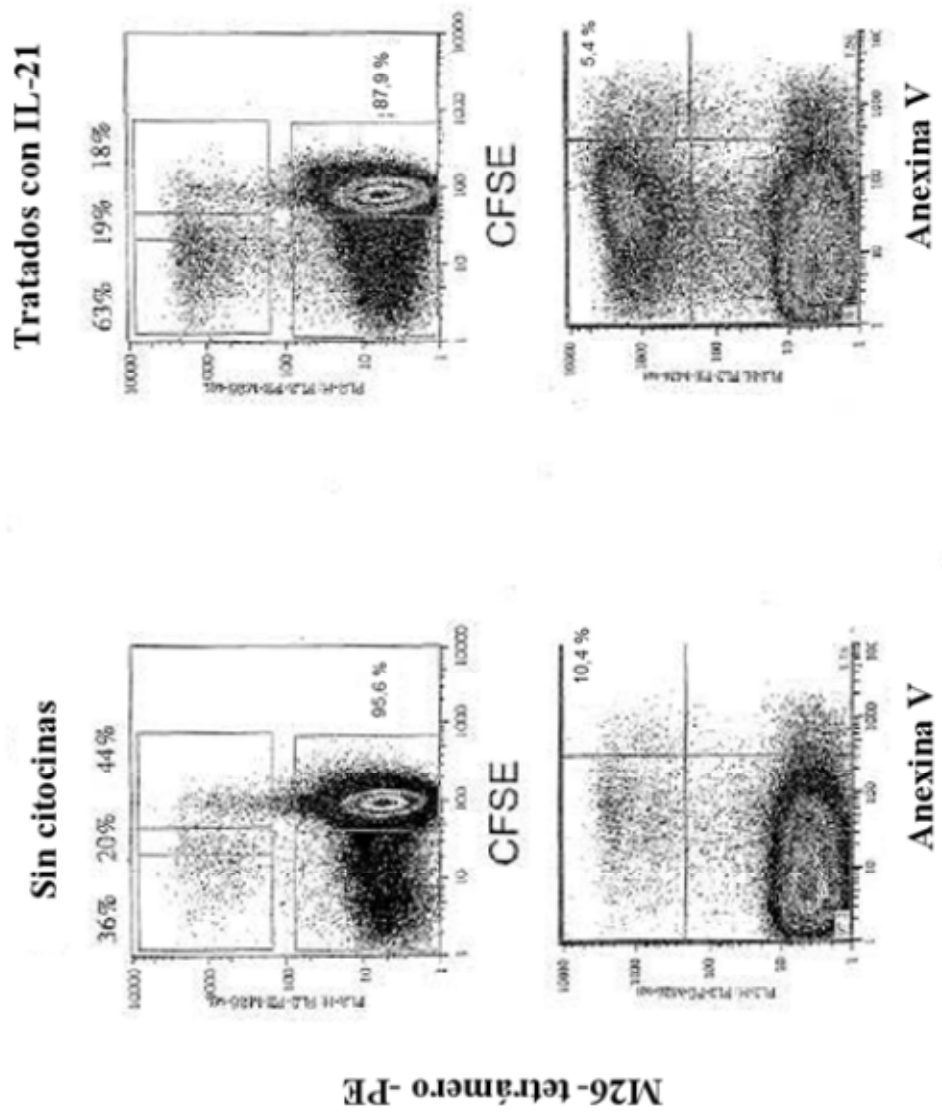


Figura 5

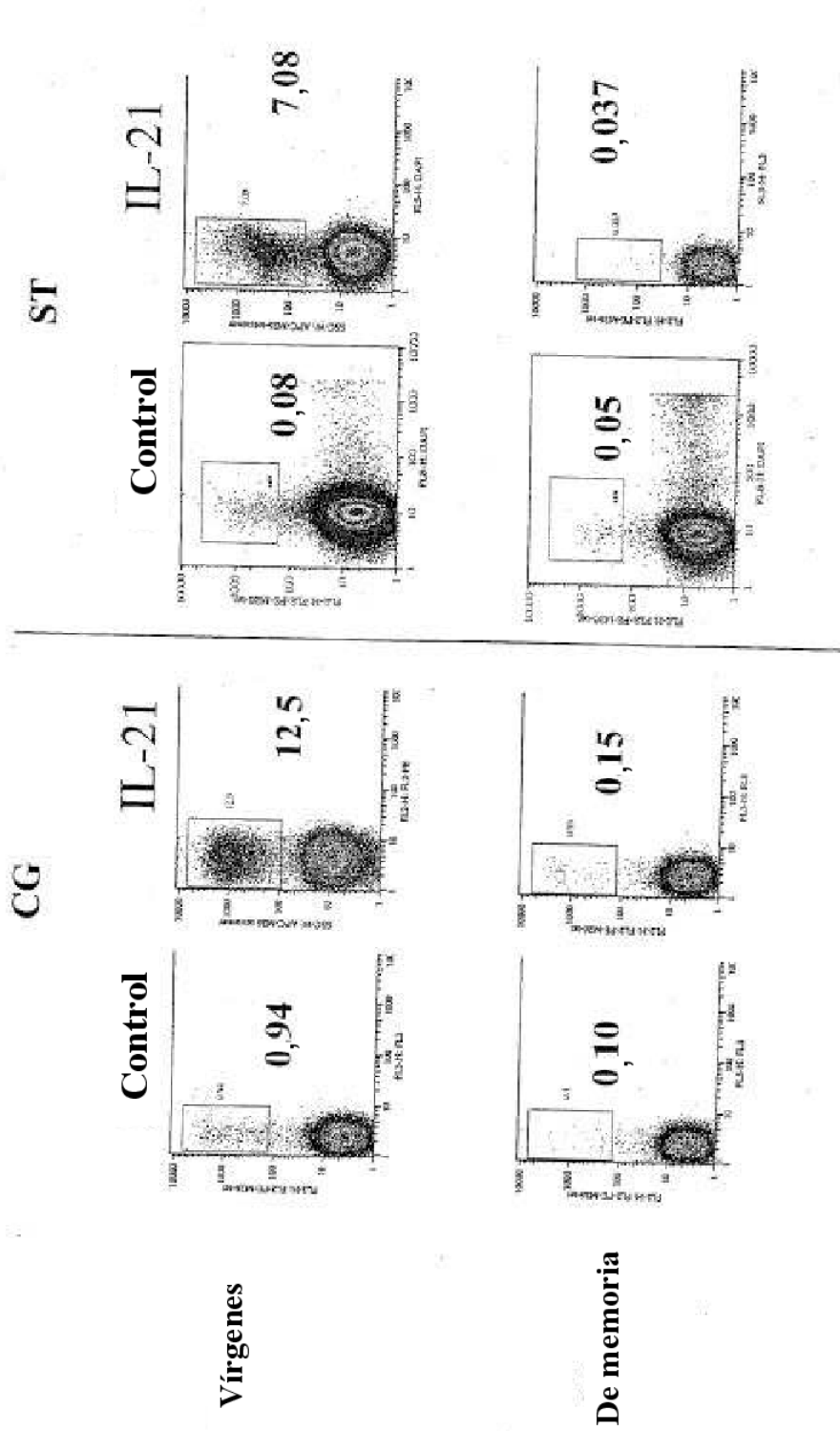


Figura 6

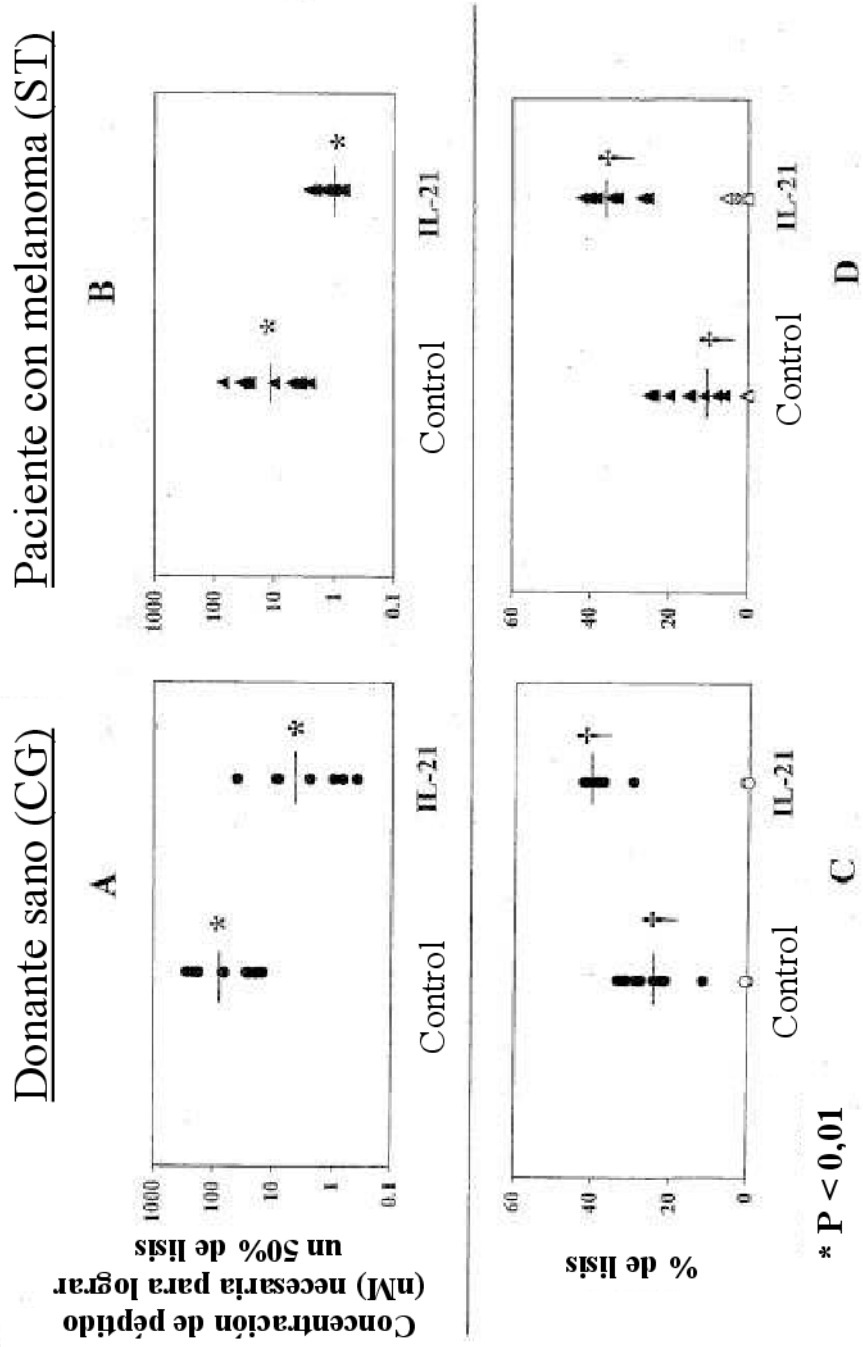


Figura 7

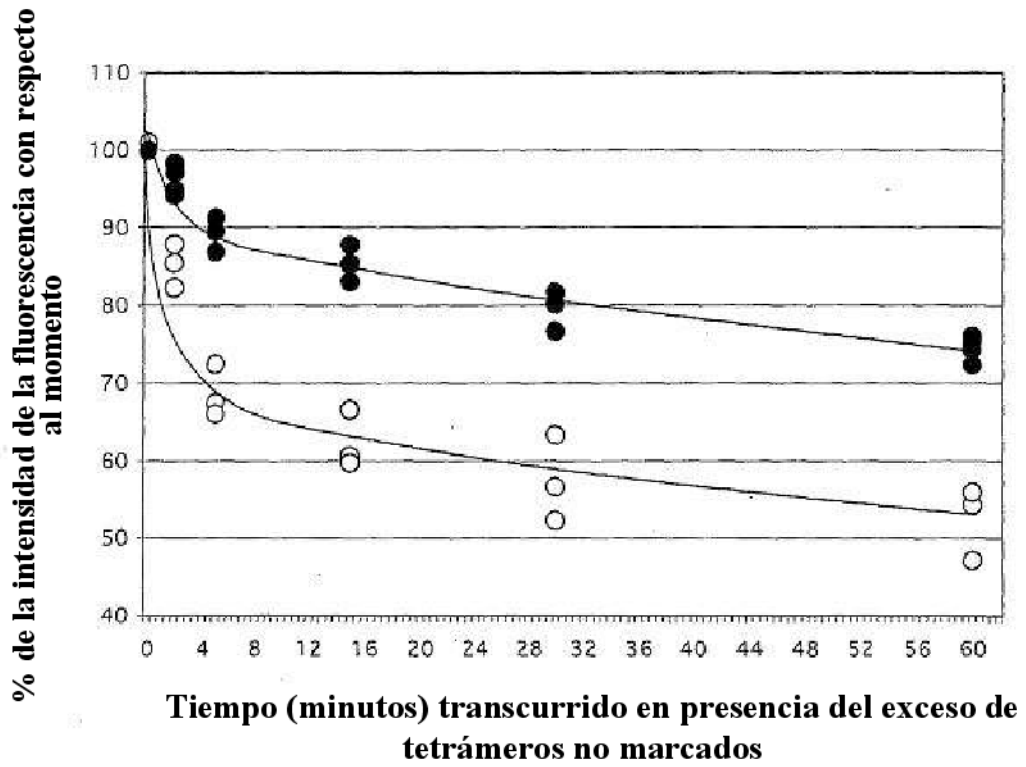


Figura 8

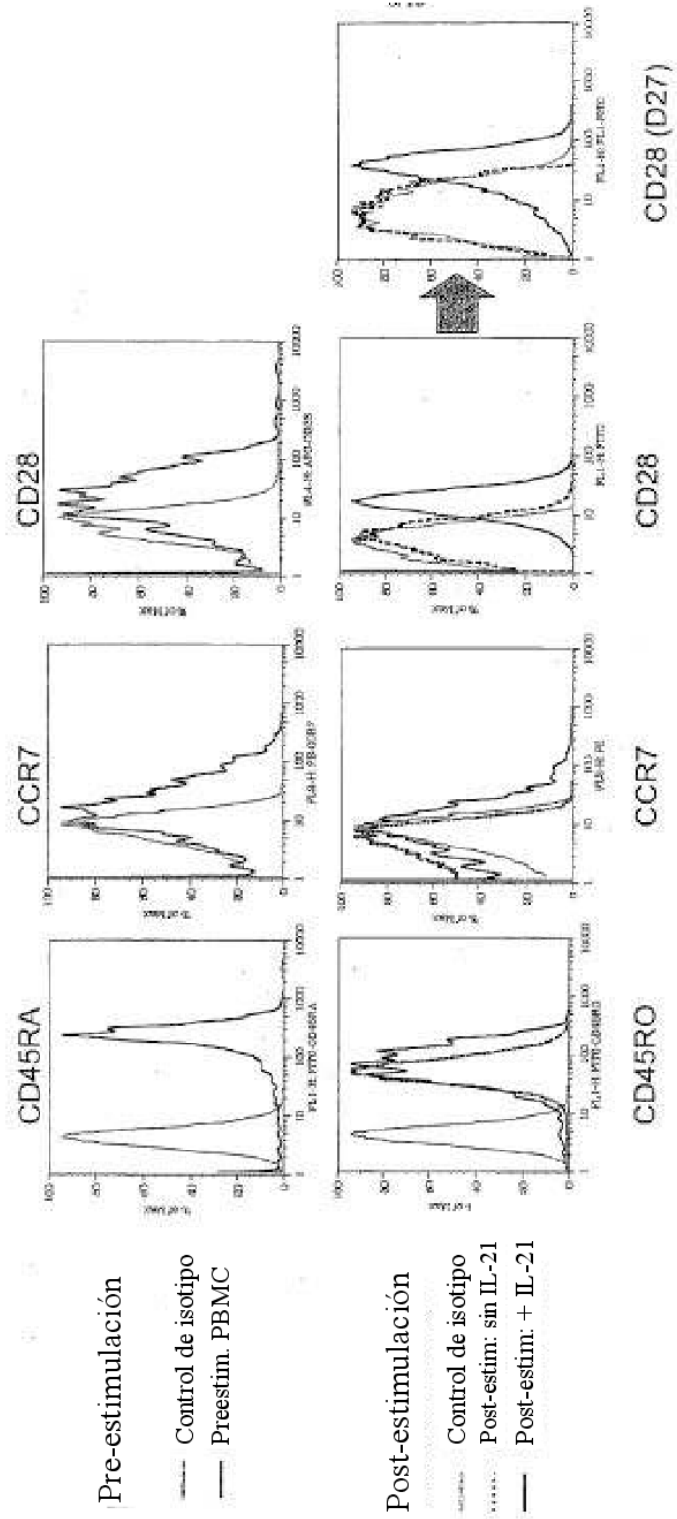


Figura 9

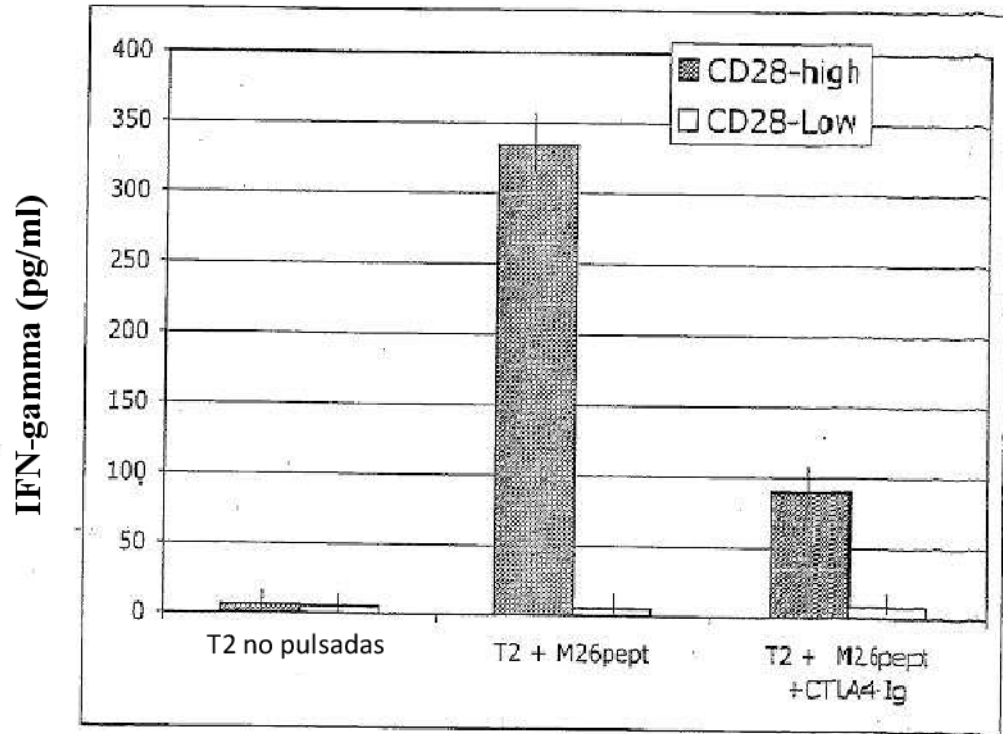


Figura 10

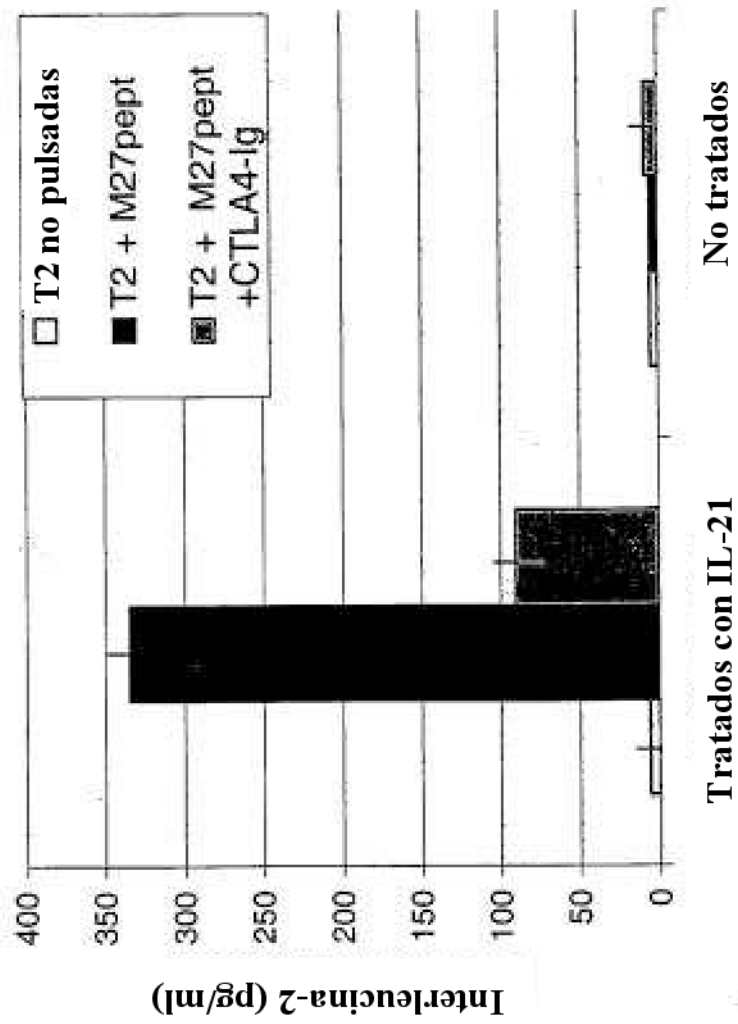


Figura 11

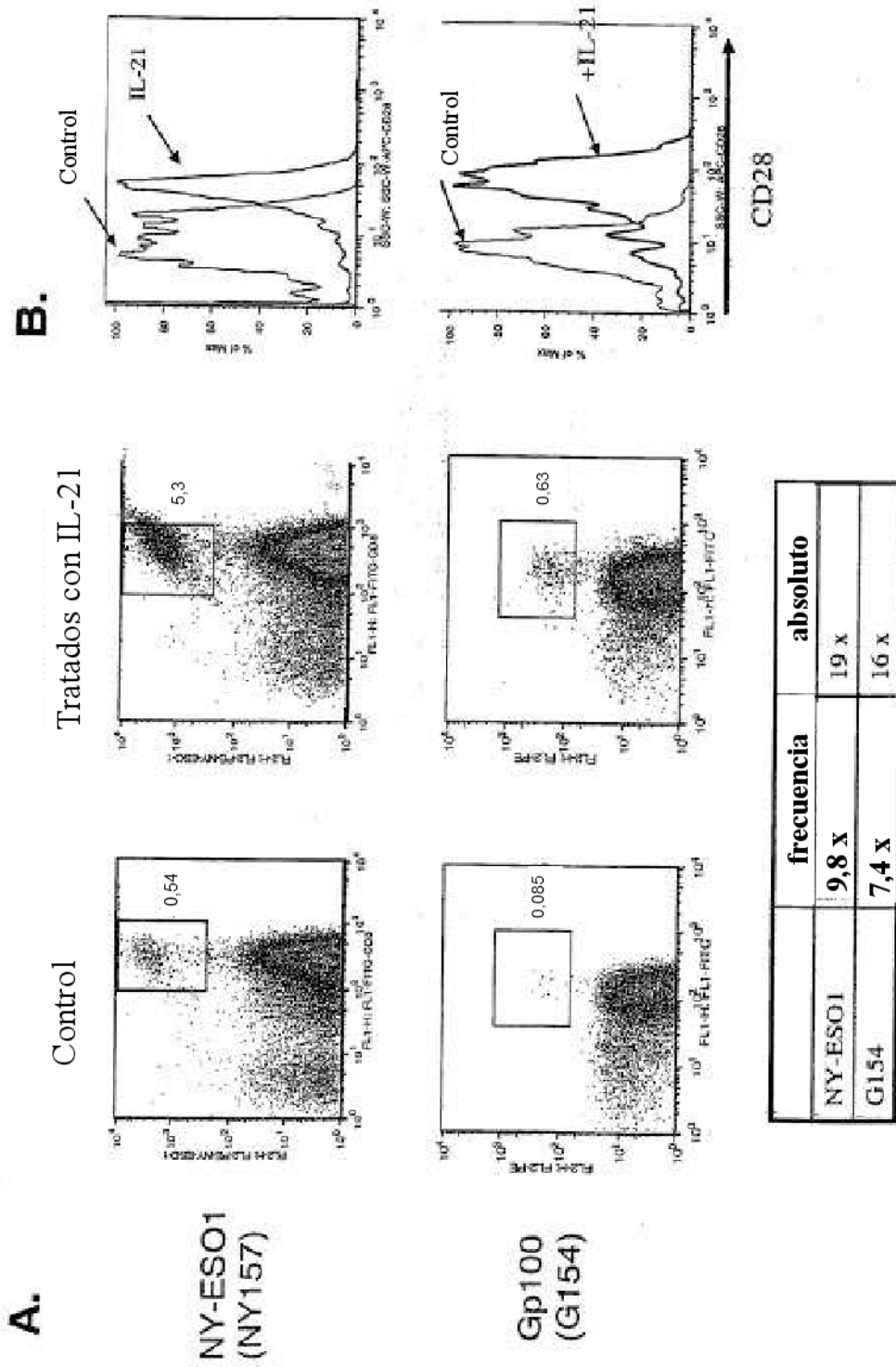


Figura 12

La adición de la IL-21 a la IL-6, IL-12, IL-15 o la IL-7 durante la estimulación primaria potencia las respuestas de los linfocitos T CD8

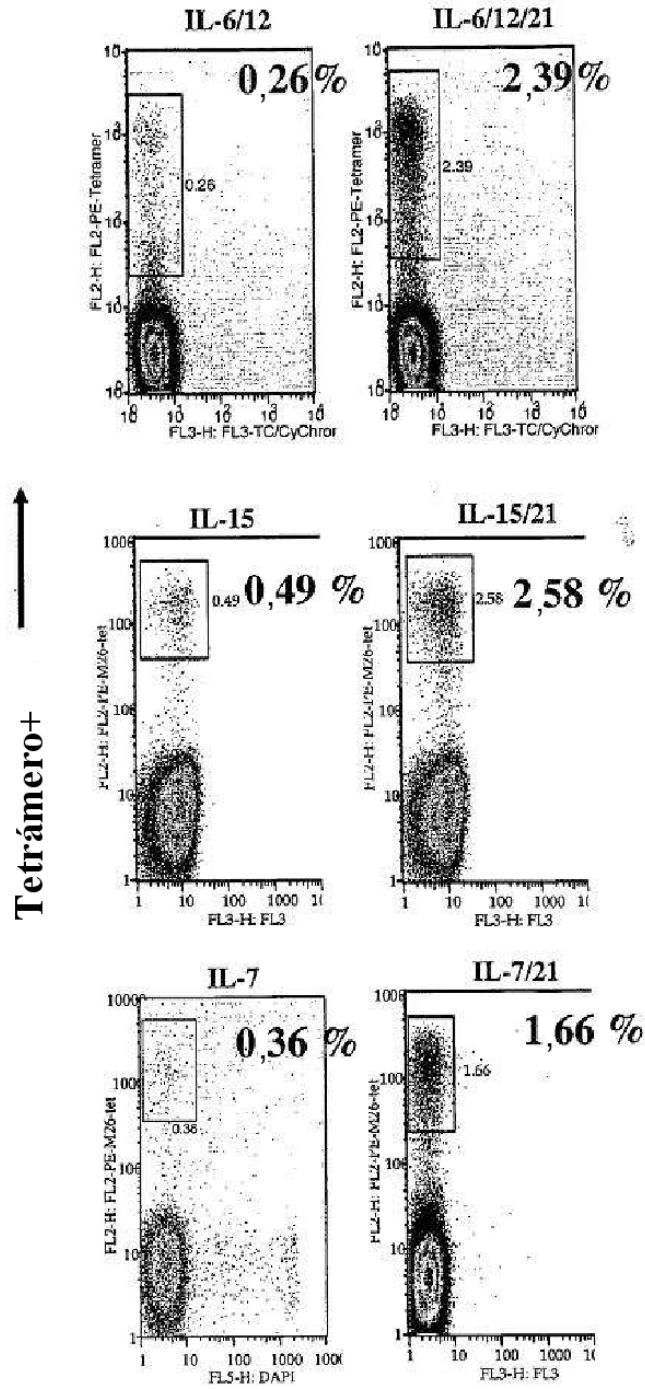


Figura 13

La combinación de la IL-21 con la IL-6 o la IL-12 aumenta la frecuencia y prolonga la supervivencia de los CTL específicos de antígeno

