

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 967**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2012 PCT/US2012/032322**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12138858**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 12767723 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2694640**

54 Título: **Inversión de los efectos del microentorno tumoral utilizando receptores quiméricos de citocinas**

30 Prioridad:

08.04.2011 US 201161473457 P

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

16.01.2018

73 Titular/es:

**BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (100.0%)
One Baylor Plaza
Houston, TX 77030, US**

72 Inventor/es:

**LEEN, ANN MARIE y
VERA, JUAN F.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 649 967 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

Inversión de los efectos del microentorno tumoral utilizando receptores quiméricos de citocinas

5 **Campo técnico**

El campo de la invención incluye al menos de forma general los campos de la inmunología, la biología celular, la biología molecular y la medicina.

10 **Antecedentes de la invención**

Las quimio y radioterapia convencionales a menudo producen un beneficio insuficiente, acentuando la necesidad de nuevos tratamientos. La transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígeno asociados a tumor (AAT) expandidos *in vitro* puede tratar de forma eficaz tumores, incluyendo el linfoma de Hodgkin, el carcinoma nasofaríngeo, el neuroblastoma y el melanoma, por ejemplo. Aunque la infusión de los CTL dirigidos a AAT expresados por el cáncer es útil desde el punto de vista terapéutico, al menos algunos tumores utilizan múltiples mecanismos de evasión inmunitaria, que incluyen la regulación a la baja de la expresión de antígenos y la liberación de citocinas inmunomoduladoras solubles, tales como IL13 e IL14, que favorece el desarrollo de una respuesta inmunitaria de tipo Th2 en lugar de una de tipo Th1 citotóxica. La presente invención proporciona una solución a una necesidad en la técnica de facilitar la superación de tales medidas evasivas por parte del tumor.

Wilkie *et al.* (2010) describe la expansión selectiva de células T dirigidas a un receptor quimérico de antígeno con potente función efectora utilizando interleucina 4.

25 **Breve resumen de la invención**

El crecimiento tumoral progresivo puede estar asociado con la supresión de la respuesta inmunitaria. Pueden contribuir a la evasión inmunitaria muchos mecanismos distintos, sin embargo muchos tipos de cánceres han aprovechado el papel regulador de las citocinas para regular a la baja las respuestas inmunitarias apropiadas dirigidas a destruir células cancerosas. Hacen esto secretando citocinas inmunosupresoras que sirven para reunir células inmunitarias reguladoras para el tumor e inhibir de forma directa y/o repolarizar las células T Th1 citotóxicas hacia un fenotipo Th2 ineficaz. Las citocinas inmunosupresoras que secretan las células cancerosas o el estroma tumoral circundante incluyen al menos interleucina (IL) 13, IL4, TGF-beta (factor de crecimiento transformante beta), IL6, IL8 e IL-10.

Las realizaciones de la invención proporcionan una estrategia nueva para hacer resistentes frente las citocinas inmunosupresoras/inhibidoras a las células T reactivas al tumor presentes en el microentorno tumoral. Determinadas realizaciones de la invención se refieren a una expansión y actividad antitumoral mejoradas de los CTL específicos para tumor utilizando un receptor quimérico de citocinas transgénico.

Las realizaciones de la invención proporcionan una estrategia nueva para hacer a las células T Th1 efectoras resistentes al entorno de citocinas inhibidoras presente en el microentorno tumoral. Tales realizaciones abarcan células T específicas de tumor nativas o modificadas genéticamente con un receptor quimérico que se une a citocinas inhibidoras/supresoras, y convierte sus consecuencias intracelulares en una señal inmunoestimuladora/activadora de Th1, mejorando así la eficacia de las células T específicas de tumor.

Por ejemplo, se describen en el presente documento vectores tales como los vectores retrovíricos bicistrónicos ejemplares, que codifican los exodominios de los receptores de las citocinas IL4 y/o IL13 fusionados con los endodominios de transducción de señales de los receptores de las citocinas IL2 y/o IL7. De forma similar, se describe en el presente documento un vector tal como un vector retrovílico que codifica los exodominios del receptor de la citocina IL10 fusionado con los endodominios de transducción de señales de los receptores de las citocinas IL2 y/o IL1.

En aspectos concretos descritos en el presente documento, los cánceres en los que están presentes en el microentorno una o más de IL13, IL4 y/o IL10 (u otras) incluyen esencialmente a todos los tumores sólidos. Los cánceres ejemplares particulares incluyen al menos: cáncer de páncreas, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario y etcétera.

Las realizaciones de la invención son útiles para modificar, por ejemplo, células T primarias, linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno tumoral de origen natural y células NK. Las células T/NK modificadas utilizando la presente invención pueden utilizarse en un contexto autólogo o alogénico.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, existen moléculas quiméricas que pueden convertir señales inmunoreguladoras negativas en señales positivas. Esta estrategia implica, solo a modo de ejemplo, fusionar los exodominios de IL-4 y/o IL-13 con los endodominios transductores de señales de los receptores de IL-2

y/o IL-7. Esta estrategia puede utilizarse para hacer a las células Th1 efectoras resistentes a las señales negativas de citocinas que a menudo están presentes en el microentorno tumoral.

5 La presente divulgación se refiere a la inversión de los efectos del microentorno tumoral utilizando receptores quiméricos de citocinas: los exodominios de IL-4 y/o IL-13 fusionados con los endodominios de los receptores de IL-2 y/o IL-7.

10 La presente invención permite invertir los efectos del microentorno tumoral utilizando receptores quiméricos de citocinas: los exodominios de IL-4 e IL-13 fusionados con los endodominios de los receptores de IL-7 e IL-2 respectivamente.

15 En algunos aspectos descritos en el presente documento, existe un método para prevenir la inhibición o repolarización de las células T Th1 citotóxicas hacia células que tengan un fenotipo Th2, que comprende la etapa de modificar las células T específicas de tumor para comprender un receptor quimérico que se une a citocinas inhibidoras o supresoras, en el que tras la unión de las citocinas inhibidoras o supresoras al receptor quimérico, la inhibición o la re-polarización de las células T Th1 citotóxicas de este modo se previene. En aspectos concretos descritos en el presente documento, el receptor quimérico comprende el exodominio del receptor (o receptores) de la citocina IL10, IL4 y/o IL13 y comprende el endodominio de transducción de señales del receptor (o receptores) de la citocina IL12 y/o IL7. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el receptor quimérico
20 comprende el exodominio de una citocina inmunosupresora y el endodominio de las citocinas que transmiten las señales de Th1.

25 En algunos aspectos descritos en el presente documento, existe un vector que comprende un receptor quimérico que comprende el exodominio de un receptor de citocina inmunosupresora y el endodominio de un receptor de citocina que transmite las señales de Th1. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el exodominio de una citocina inmunosupresora es un exodominio del receptor de la citocina IL10, IL4 y/o IL13. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el endodominio de un receptor de citocina que transmite señales de Th1 es un endodominio de un receptor de citocina para los receptores de la citocina IL2 y/o IL7. El vector puede ser de cualquier tipo, incluyendo un vector retroviral, un vector adenoviral, un plásmido o un vector vírico
30 adenoasociado. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el receptor quimérico comprende el exodominio de IL4 y el endodominio de IL7.

La presente invención proporciona:

- 35 - una célula del sistema inmunitario que comprende un receptor quimérico de citocina que comprende un exodominio de unión a citocina y un endodominio de transducción de señales, en el que el exodominio es un exodominio del receptor de IL4 y el endodominio es el endodominio del receptor IL7 o el exodominio es el exodominio del receptor de IL13 y el endodominio es el endodominio del receptor de IL2, en el que la célula es una célula T primaria, un linfocito T o una célula NK;
- 40 - un método de producción de una célula T primaria, un linfocito T o una célula NK que comprende receptor quimérico de citocina que comprende un exodominio de unión a citocina y un endodominio de productor de señales, en el que el exodominio es el exodominio del receptor de IL4 y el endodominio es el endodominio del receptor de IL7 o el exodominio es un exodominio del receptor de IL13 y el endodominio es el endodominio del receptor de IL2, comprendiendo el método transfectar con un vector de expresión que codifica el receptor quimérico una célula T primaria, un linfocito T o una célula NK obtenida de un individuo; y
- 45 - una célula de la invención para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un individuo, comprendiendo el método suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de las células.
- 50

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente invención se hará referencia ahora a las siguientes descripciones tomadas junto con los dibujos adjuntos, en que:

- 55 FIG. 1. Representación esquemática de la señalización de IL4 e IL13.
- FIG. 2. A) Mapa de vector de las construcciones ejemplares n.º 1 y n.º 2. B) evaluación de la eficacia de transducción mediante la expresión de GFP (n.º 1) y mOrange (n.º 2); C) Fosfo Stat5 tras 10 min de exposición a citocina; D) CTL transducidos y de control cultivados en IL2, 4 o 13.
- 60 FIG. 3A Construcción ejemplar n.º 3. 3B. Representación esquemática de la señalización de IL4 e IL13 en células transgénicas.
- 65 FIG. 4 Fusión ejemplar de IL4Rα/IL7Rα ("4/7R") y un gen indicador.

La FIG. 5 muestra la expresión estable de IL4R y mOrange en células transducidas.

La FIG. 6 muestra a pSTAT5 en células transgénicas tras la administración de IL-4.

5 La FIG. 7 demuestra que la expresión de 4/7R que no afecta de forma adversa la función CTL.

La FIG. 8 muestra que las células T transgénicas que expresan 4/7R proliferan *in vitro* en presencia de IL-4.

10 La FIG. 9 muestra que los CTL que expresan 4/7R pueden empobrecer a IL4 en el sobrenadante.

La FIG. 10 demuestra que los CTL que expresan 4/7R son resistentes a otras citocinas inmunosupresoras.

15 La FIG. 11 ilustra el cambio de la señalización de una citocina inmunosupresora a un factor de crecimiento de células T.

Las FIG. 12-14 demuestran que los CTL de 4/7R controlan el crecimiento tumoral.

20 La FIG. 15 se refiere a que en determinadas realizaciones se pueden modificar células T modificadas CAR-PSCA obtenidos del paciente para coexpresar por ejemplo 4/7R.

La FIG. 16 muestra que las células T CAR-PSCA modificadas para coexpresar 4/7R conservan su capacidad de destruir dianas tumorales.

25 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

30 Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, “un” o “una” puede significar uno o más. Como se utiliza en el presente documento en la reivindicación (o reivindicaciones), junto con las palabras “que comprende” las palabras “un” o “una” pueden significar uno o más de uno. Como se utiliza en el presente documento “otro” puede significar al menos un segundo elemento, o más.

35 La expresión “receptor quimérico de citocina” como se utiliza en el presente documento se refiere a un receptor diseñado técnicamente que comprende la porción de unión a citocina de un receptor unida a una porción de señalización intracelular de un receptor distinto.

La expresión “exodominio de unión a citocina” como se utiliza en el presente documento se refiere a la porción de un receptor de citocina en la superficie celular que se une a una citocina.

40 La expresión “endodominio de transducción de señal” como se utiliza en el presente documento se refiere a la porción de un receptor de citocina dentro de las células que es responsable de transmitir una señal tras la unión de la citocina.

45 II. Aspectos generales de la invención

Para superar las barreras en la técnica y desarrollar una estrategia inmunoterapéutica eficaz frente al cáncer, las realizaciones de la invención abarcan líneas de CTL (líneas de células T con especificidad nativa por el tumor) o células T modificadas con un receptor quimérico de antígeno (CAR, siglas del inglés *chimeric antigen receptor*) que se dirigen a antígenos expresados en células malignas, y el diseño técnico de estas células para expresar receptores quiméricos que contienen los exodominios de unión a citocina del receptor de IL13 α (IL13R α 1) y el IL4R α unidos a los endodominios de IL2R γ e IL7R α , que transmiten señales de Th1. En realizaciones específicas, estas manipulaciones hacen a los CTL resistentes al microentorno tumoral polarizante de Th2 y, en cambio, sostienen la señalización de Th1 para los CTL dirigidos a AAT. Se pueden examinar muestras de pacientes de cáncer y documentar el patrón de la expresión de AAT, y los niveles y patrón de las citocinas Th2 producidas.

50 Después, se puede determinar si se pueden expandirse los CTL que se dirigen frente a antígenos expresados, a partir de las CMSP del paciente y caracterizar los efectos de su modificación para que se mantengan polarizados hacia una actividad de Th1 incluso en el microentorno tumoral inductor de Th2. En aspectos concretos descritos en el presente documento, pueden generarse a partir de CMSP del paciente células T reactivas frente a antígenos asociados a cáncer de páncreas (a modo solo de ejemplo) y modificarse para conservar la función de Th1 incluso en el entorno de citocinas Th2 del tumor. Tales aspectos pueden examinarse como sigue: 1) documentar el patrón de expresión de AAT y evaluar el perfil de citocinas de las muestras de biopsia primaria; 2) generar CTL reactivos al tumor específicos para múltiples antígenos diana asociados a cáncer de páncreas y evaluar su especificidad y función *in vitro*; y 3) proteger a los CTL de los efectos inhibidores de la señalización con citocinas Th2 mediante la expresión forzada de receptores quiméricos de citocina. Después de esto, se puede evaluar la seguridad y la

65 eficacia antitumoral de los AAT-CTL en los individuos con cáncer, incluyendo cáncer de páncreas.

La supervivencia y expansión de los CTL específicos de tumor es importante para una eficacia óptima *in vivo* de las terapias con células T. Aunque la administración de IL2 puede producir estos efectos, está asociada con toxicidad y la expansión de poblaciones de células T inhibitorias que limitan el beneficio. La expresión transgénica del receptor de IL7 puede mejorar la supervivencia y expansión de los CTL, pero solo es beneficioso con la administración exógena repetida de citocina IL7, que es cara, depende de la disponibilidad de un producto con calidad clínica, y que puede estar en concentraciones inadecuadas en el sitio de tumor. Las realizaciones de la presente invención proporcionan respuestas de células T manipuladas para IL4, una citocina que está presente en abundancia de forma endógena en el microentorno de varios tumores y está asociada de otra forma con acciones protumorigénicas, incluyendo la proliferación de células cancerosas, la protección de células tumorales frente a la apoptosis y la repolarización de células T citotóxicas específicas de tumor hacia un fenotipo Th2 supresor. Para invertir los efectos inhibidores de la IL4 sobre los CTL específicos de tumor y en cambio permitirles utilizar IL4 como un factor de crecimiento, los inventores diseñaron técnicamente un vector retroviral que codifica el exodominio de IL4R α (porción de unión a citocina) fusionado con el endodominio (dominio de señalización) del IL7R, y unido con mOrange para permitir la detección del transgén. Para determinar si la expresión transgénica de IL4/7R quimérico mejora la supervivencia y expansión de los CTL, los inventores utilizaron la destrucción de un tumor virus de Epstein Barr+ (VEB+) por los CTL específicos de VEB. Tras la transducción, los CTL IL4/7R eran detectables por citometría de flujo (doble positivos mOrange, IL4R) en el 13-76 % de los CTL-VEB. La molécula transgénica fue funcional dado que la adición de IL4 fosforiló STAT5 solo en los CTL-VEB/IL4/7R+ a niveles similares a los conseguidos tras la administración de IL2. En respuesta a IL2 se expandieron tanto los CTL transgénicos como de control (aumento de 1×10^6 a $3,5 \times 10^7$ y $5,3 \times 10^7$ células, respectivamente), pero solo se expandieron CTL-VEB/IL4/7R+ en presencia de IL4 (1000 U/ml) (de 1×10^6 a $2,9 \times 10^7$ frente a $3,2 \times 10^6$ CTL, respectivamente) durante 1 semana. Como se anticipó, la subpoblación transgénica de CTL-VEB se seleccionó de forma positiva en presencia de IL4 (aumento del 13 % al 80 % en 1 semana) en comparación con los CTL cultivados en IL2. Después de la expansión con IL4, los CTL transgénicos seguían siendo policlonales, con un perfil de memoria efectora, y conservaron la especificidad de antígeno medida por la liberación de IFN γ , la unión a pentámeros de VEB y la destrucción restringida por MHC de VEB-LCL autólogos. Notablemente, la expansión de los CTL se mantuvo estrictamente dependiente de antígeno y citocina, ya que la retirada de cualquiera de los estímulos interrumpió la expansión. Estas características *in vitro* se repitieron *in vivo* en un modelo de ratón de xenoinjerto en que los CTL-VEB/IL4/7R se expandieron en respuesta a IL2 o IL4, y mantuvieron su actividad anti-tumor por VEB. Para finalizar, los CTL se cultivaron en presencia de sobrenadante recogido de tumores productores de IL-4. Solo los CTL transgénicos empobrecieron la citocina en el medio. Por lo tanto, en realizaciones de la invención los IL4/7R CTL tienen la capacidad de utilizar la IL4 derivada de tumor como un factor de crecimiento y de servir como un "disipador" que empobrece la citocina en el microentorno tumoral, privando así a la neoplasia de una proteína que de otra forma beneficiaría el crecimiento y la supervivencia tumoral.

III. Antígenos asociados a tumor

En realizaciones en las que para el tratamiento y/o la prevención del cáncer se emplean CTL específicos para múltiples AAT, pueden tenerse como diana una diversidad de AAT. Los antígenos tumorales son sustancias producidas en las células tumorales que desencadenan una respuesta inmunitaria en un hospedador.

Los antígenos tumorales ejemplares incluyen al menos los siguientes: antígeno carcinoembrionario (ACE) para los cánceres de colon; CA-125 para el cáncer de ovario; MUC-1 o antígeno tumoral epitelial (ATE) o CA15-3 para cáncer de mama; tirosinasa o antígeno asociado a melanoma (MAGE, sigla del inglés *melanoma associated antigen*) para melanoma maligno; y productos anómalos de ras, p53 para una diversidad de tipos de tumores; alfafetoproteína para hepatoma, cáncer de ovario o de testículo; subunidad beta de la GCH para los hombres con cáncer de testículo; antígeno prostático específico para cáncer de próstata; microglobulina beta 2 para mieloma múltiple y en algunos linfomas; CA19-9 para cáncer colorrectal, de las vías biliares y pancreático; cromogranina A para cáncer de pulmón y de próstata; TA90, GP100 y MelanA/MART1 para melanoma, sarcomas de tejido blando y cáncer de mama, colon y pulmón. Los ejemplos de antígenos tumorales son conocidos en la técnica, por ejemplo en Cheever *et al.*, 2009.

Los ejemplos específicos de antígenos tumorales incluyen al menos, por ejemplo, ACE, MHC, CTLA-4, gp100, mesotelina, PD-L1, TRP1, CD40, EGFP, Her2, TCR alfa, trp2, TCR, MUC1, cdr2, ras, 4-1BB, CT26, GITR, OX40, TGF- α . WT1, MUC1, LMP2, E6 E7 de VPH, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE A3, p53 no mutante, NY-ESO-1, PSMA, GD2, Melan A/MART1, mutante de Ras, gp 100, mutante de p53, Proteinasa3 (PR1), bcr-abl, Tirosinasa, Survivina, PSA, hTERT, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógeno, Ciclina B1, ácido polisialico, MYCN, RhoC, TRP-2, GD3, Fucosil GM1, Mesotelina, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, LMA por ETV6, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR- β , MAD-CT-2 y antígeno relacionado con Fos 1.

IV. Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación pueden codificar un receptor quimérico de citocina. El ácido nucleico puede obtenerse de ADN genómico, ADN complementario (ADNc) o ADN sintético.

Un "ácido nucleico" como se utiliza en el presente documento incluye moléculas monocatenarias o bicatenarias, así como ADN, ARN, ácidos nucleicos modificados químicamente y análogos de ácido nucleico. Dentro del ámbito de la presente divulgación se contempla que un ácido nucleico puede ser de casi cualquier tamaño, determinado en parte por la longitud de la proteína o péptido codificado.

5 Se contempla que los receptores quiméricos de citocina pueden estar codificados por cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique la secuencia de aminoácidos apropiada. El diseño y producción de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos deseada son bien conocidos para los expertos en la materia, que utilizan tablas de codones convencionales. En aspectos preferentes descritos en el presente documento, los codones
10 seleccionados para que codifiquen cada uno de los aminoácidos pueden modificarse para optimizar la expresión del ácido nucleico en la célula hospedadora de interés.

V. Suministro dirigido de los vectores para terapia génica

15 En aspectos particulares descritos en el presente documento se emplean vectores que permiten la integración en lugar de la expresión transitoria, tal como retrovirus, lentivirus y transposones.

Existen varios modos en que pueden introducirse los vectores para terapia génica en las células. En determinados aspectos descritos en el presente documento, el vector para terapia génica comprende un virus. La capacidad de
20 determinados virus para entrar a las células a través de endocitosis mediada por receptor, de integrarse en el genoma de la célula hospedadora o de mantenerse de forma episómica, y de expresar genes víricos de forma estable y eficaz los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños en células de mamífero (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubinstein, 1988.; Baichwal y Sugden, 1986; Temin, 1986). Los vectores para terapia génica preferentes son en general vectores víricos. Los virus de ADN utilizados como vectores para terapia génica
25 incluyen los papovavirus (por ejemplo, virus del simio 40, virus del papiloma bovino y de polioma) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y adenovirus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986).

Otros vectores de transferencia de genes pueden construirse a partir de retrovirus. (Coffin, 1990). Para construir un vector retrovírico, se inserta un ácido nucleico que codifica una proteína de interés en el genoma viral en el lugar de
30 determinadas secuencias víricas para producir un virus que tiene replicación defectuosa. Para producir viriones, se construye una línea celular empaquetadora que contiene los genes *gap*, *pol* y *env*, pero sin los LTR y los componentes de empaquetado (Mann *et al.*, 1983). Cuando se introduce en esta línea celular (mediante precipitación con fosfato de calcio, por ejemplo) un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con el LTR retrovírico y las secuencias de empaquetado, la secuencia de empaquetado permite empaquetar en partículas
35 virales el transcrito de ARN del plásmido recombinante, que después se secretan en el medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). Después, se recoge el medio que contiene los retrovirus recombinantes, de forma opcional se concentra y se utiliza para transferencia génica. Los vectores retrovíricos tienen la capacidad de infectar una amplia diversidad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de las células hospedadoras (Paskind *et al.*, 1975).

40 Pueden emplearse otros vectores víricos como vectores dirigidos para terapia génica. Pueden emplearse vectores obtenidos de virus tales como virus vaccinia (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), virus adeno-asociados (VAA) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984) y virus herpes.

45 En un aspecto adicional descrito en el presente documento, la construcción para terapia génica incluirse en un liposoma. El suministro de ácidos nucleicos mediados por liposomas y la expresión de ADN extraño *in vitro* ha sido muy satisfactoria. Wong *et al.*, (1980) demostraron la viabilidad del suministro mediado por liposomas y la expresión de ADN extraño en embriones de pollo, células cultivadas HeLa y de hepatoma. Nicolau *et al.*, (1987) llevó a cabo en ratas una transferencia génica mediada por liposomas satisfactoria tras inyección intravenosa.

50 Los vectores para terapia génica descritos en el presente documento pueden comprender diversos transgenes, que están codificados normalmente en el ADN o ARN de un vector de expresión. La terapia génica puede utilizarse para la expresión de un gen terapéutico, la expresión de PAA para potenciar la neovascularización o para la inhibición de la expresión de PAA para el tratamiento de enfermedades asociadas con la neovascularización. El ADN puede estar
55 en forma de ADNc, ADN polimerizado *in vitro*, ADN plasmídico, partes de un ADN plasmídico, material genético obtenido de un virus, ADN lineal, vectores (P1, PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), casetes de expresión, secuencias quiméricas, ADN recombinante, ADN cromosómico, un oligonucleótido, ADN antisentido o derivados de estos grupos. El ARN puede estar en forma de ARN oligonucleotídico, ARNt (ARN de transferencia), ARNpn (ARN pequeño nuclear), ARNr (ARN ribosómico), ARNm (ARN mensajero), ARN polimerizado *in vitro*, ARN recombinante,
60 secuencias quiméricas, ARN antisentido, ARNip (ARN de interferencia pequeño), ribozimas o derivados de estos grupos. Un polinucleótido antisentido es un polinucleótido que interfiere con la función del ADN y/o el ARN. Los polinucleótidos antisentido incluyen, pero sin limitación: morfolinós, polinucleótidos 2'-O-metilo, ADN, ARN y similares. Los ARNip comprenden una estructura bicatenaria que normalmente contiene 15-20 pares de bases y preferentemente 21-25 pares de bases, y que tienen una secuencia de nucleótidos idéntica o casi idéntica a un gen diana o ARN expresado dentro de la célula. La interferencia puede tener como resultado la supresión de la
65 expresión. El polinucleótido también puede ser una secuencia cuya presencia o expresión en una célula modifica la

expresión o función de genes o ARN celulares, por ejemplo, PAA. Además, el ADN o ARN puede ser mono, bi, tri o tetracatenario.

VI. Composiciones farmacéuticas

5 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden una cantidad eficaz de una o más composiciones que incluyen un vector o una célula que porta un vector, en el que el vector codifica un receptor quimérico de citocina descrito en el presente documento, disuelto o disperso en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades y composiciones
10 moleculares que no producen una reacción adversas, alérgica u otra desafortunada cuando se administra a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según corresponda. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una composición descrita en el presente documento o un principio activo adicional será conocida para los expertos en la materia, a la vista de la presente divulgación, como ejemplifica Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración animal (por
15 ejemplo, humana), se entenderá que las preparaciones deberán cumplir normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, según requiere la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

Como se utiliza en el presente documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes
20 antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retraso de la adsorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármaco, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes, tales materiales y combinaciones de los mismos, como conocería un experto en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, pág. 1289-1329). Excepto en la medida en que algún excipiente convencional sea incompatible con
25 el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Las composiciones terapéuticas y de diagnóstico descritas en el presente documento pueden comprender distintos tipos de excipientes dependiendo de si se administrarán en forma sólida, líquida o en aerosol, y si necesitan estar
30 estériles para tales vías de administración. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intrarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intrarticular, intrapleural, intratraqueal, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intravesicular, sublingual, mediante inhalación (por ejemplo, inhalación en aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que baña de forma directa las células diana, a través de un catéter, a través de un lavado, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas) o mediante otro método o cualquier combinación de los anteriores, como
35 conocería un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990).

La cantidad de dosificación real de una composición descrita en el presente documento administrada a un sujeto puede determinarse por factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo
40 de enfermedad a tratar, las intervenciones terapéuticas anteriores o simultáneas, las enfermedades de origen desconocido del paciente y la vía de la administración. En cualquier caso, el facultativo responsable de la administración determinará la concentración del principio activo (o principios activos) en una composición y la dosis (o dosis) apropiada para el sujeto individual.

En determinados aspectos descritos en el presente documento, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1 % de un compuesto activo. En otros aspectos descritos
45 en el presente documento, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable de los mismos. En otros ejemplos no limitativos, una dosis puede comprender también de aproximadamente 1 µg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 µg/kg/peso corporal,
50 aproximadamente 10 µg/kg/peso corporal, aproximadamente 50 µg/kg/peso corporal, aproximadamente 100 µg/kg/peso corporal, aproximadamente 200 µg/kg/peso corporal, aproximadamente 350 µg/kg/peso corporal, aproximadamente 500 µg/kg/peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg/peso corporal,
55 aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg/peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable de los mismos. En los ejemplos no limitativos de un intervalo derivable de las cifras enumeradas en el presente documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5
60 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg/peso corporal, a base de las cifras descritas anteriormente.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. De forma adicional, la prevención de la acción de los microorganismos puede efectuarse mediante
65 conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen, pero sin limitación parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o

combinaciones de los mismos.

En aspectos descritos en el presente documento en que la composición está en forma líquida, un excipiente puede ser un disolvente o un medio de dispersión que comprende, pero sin limitación, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o combinaciones de los mismos.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el radical de direccionamiento de PAA o un conjugado del mismo en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado, con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son las técnicas de secado al vacío o de liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado, a partir de un medio líquido esterilizado por filtración de forma previa del mismo. El medio líquido debería tamponarse de forma adecuada, si es necesario, y primero hacerse isotónico el diluyente líquido antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones para inyección directa, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, suministrando altas concentraciones de los agentes activos a un área pequeña.

La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación con endotoxina debería mantenerse a un nivel mínimo de seguridad, por ejemplo, inferior a 0,5 ng/mg de proteína.

VII. Terapia de combinación

En determinados aspectos descritos en el presente documento, los métodos descritos en el presente documento para aspectos clínicos se combinan con otros agentes eficaces en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa, tal como agentes antineoplásicos. Un agente "antineoplásico" tiene la capacidad de afectar de forma negativa al cáncer en un sujeto, por ejemplo, destruyendo células cancerosas, induciendo la apoptosis en células cancerosas, reduciendo la velocidad de crecimiento de células cancerosas, reduciendo la incidencia o la cantidad de metástasis, reduciendo el tamaño tumoral, inhibiendo el crecimiento tumoral, reduciendo la irrigación de un tumor o de células cancerosas, estimulando una respuesta inmunitaria frente a células cancerosas o un tumor, previniendo o inhibiendo la progresión del cáncer, o aumentando la vida de un sujeto con cáncer. De forma más general, estas otras composiciones se proporcionarán en una cantidad combinada eficaz para destruir o inhibir la proliferación de la célula. Este procedimiento pueden implicar poner en contacto las células cancerosas con la construcción de expresión y al agente (o agentes) o múltiples factores al mismo tiempo. Esto puede conseguirse poniendo en contacto a la célula con una única composición o formulación farmacéutica que incluya ambos agentes o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en la que una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye al segundo agente (o agentes).

La resistencia de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos y radioterapéuticos representa un problema importante en la oncología clínica. Un objetivo de la actual investigación en cáncer es hallar modos de mejorar la eficacia de la quimio- y la radioterapia, combinándolas con la terapia génica. Por ejemplo, cuando se suministró el gen de la timidina quinasa del herpes simple (HS-tK) a tumores cerebrales, mediante un sistema de vector retroviral, se indujo de forma satisfactoria susceptibilidad al agente antiviral ganciclovir (Culver, *et al.*, 1992). En el contexto de la presente divulgación, se contempla que la terapia celular pueda utilizarse de forma similar junto con una intervención quimioterapéutica, radioterapéutica o inmunoterapéutica, además de otros agentes proapoptóticos o reguladores del ciclo celular.

Como alternativa, la presente terapia de la invención puede preceder o seguir al otro agente de tratamiento a intervalos que varían de minutos a semanas. En aspectos descritos en el presente documento en donde el otro agente y la presente invención se aplican al individuo de forma separada, en general se debe asegurar que no ha transcurrido un periodo de tiempo significativo entre los momentos en que se realiza el suministro, de forma que el agente y la terapia de la invención tendrán todavía la capacidad de ejercer sobre la célula un efecto combinado de forma ventajosa. En tales casos, se contempla que se pueda poner en contacto la célula con ambas modalidades dentro de aproximadamente 12-24 h entre sí y, más preferentemente, dentro de aproximadamente 6-12 h entre sí. Sin embargo, en algunas situaciones puede ser conveniente extender el periodo de tiempo de tratamiento de forma significativa, en donde transcurren varios d (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias sem. (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las respectivas administraciones.

Pueden emplearse diversas combinaciones, la presente invención es "A" y el agente secundario, tal como radio- o quimioterapia, es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

5 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que puedan aplicarse en combinación con la terapia celular de la invención diversas terapias convencionales, así como una intervención quirúrgica.

10

a. Quimioterapia

Las terapias para el cáncer también incluyen una diversidad de terapias de combinación con tratamientos tanto químicos como basados en radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, por ejemplo, abraxano, altretamina, docetaxel, herceptin, metotrexato, novantrona, zoladex, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosourea, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la proteína farnesil transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o variante derivada de los anteriores.

15

20

b. Radioterapia

Otros factores que provocan daño del ADN y que se han utilizado extensamente incluyen los que comúnmente se conocen como rayos γ , rayos X y/o el suministro dirigido de radioisótopos a las células tumorales. También se contemplan otras formas de factores que dañan el ADN tales como microondas y radiación UV. Es muy probable que todos estos factores efectúen una amplia diversidad de daño sobre el ADN, sobre los precursores del ADN, sobre la replicación y la reparación del ADN, y sobre el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante periodos prolongados de tiempo (3 a 4 sem.), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, la fuerza y el tipo de radiación emitida y la captación por parte de las células neoplásicas.

25

30

Los términos “puesto en contacto” y “expuesto”, cuando se aplica a una célula, se utilizan en el presente documento para describir el procedimiento mediante el que una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se suministran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir la destrucción o estasis celular, ambos agentes se suministran a una célula en una cantidad combinada eficaz para destruir la célula o impedir que se divida.

35

40

c. Inmunoterapia

La inmunoterapia está basada en general en el uso de células efectoras inmunitarias y de moléculas para tener como objetivo y destruir células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de la terapia o puede incorporar otras células para que realmente efectúen la destrucción celular. El anticuerpo también puede estar conjugado a un fármaco o toxina (producto quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de la ricina, toxina colérica, toxina de *pertussis*, etc.) y servir simplemente como un agente de direccionamiento. Como alternativa, el efector puede ser un linfocito que porta una molécula de superficie que interactúa, de forma directa o indirecta, con una diana de células tumorales. Las diversas células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK.

45

50

Por lo tanto, la inmunoterapia podría utilizarse como parte de una terapia combinada, junto con la presente terapia celular. A continuación se discute la estrategia general para la terapia combinada. En general, la célula tumoral debe portar algún marcador que sea susceptible de direccionamiento, es decir, que no esté presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de ellos puede ser adecuado para el direccionamiento en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen el antígeno carcinoembrionario, el antígeno prostático específico, el antígeno asociado con tumor urinario, el antígeno fetal, la tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMGF, Antígeno Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155.

55

60

d. Genes

En otro aspecto más, el tratamiento secundario es una terapia génica en que se administra un polinucleótido terapéutico antes, después o al mismo tiempo que las presentes realizaciones clínicas. Se describe en el presente documento una diversidad de productos de expresión, incluyendo inductores de la proliferación celular, inhibidores de la proliferación celular o reguladores de la muerte celular programada.

65

e. Cirugía

Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterá a cirugía de algún tipo, lo que incluye la cirugía preventiva, de diagnóstico o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento del cáncer que puede utilizarse junto con otras terapias, tal como el tratamiento descrito en el presente documento, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

La cirugía curativa incluye la resección, en la cual se extrae físicamente, se extirpa y/o se destruye todo o una parte del tejido canceroso. La resección tumoral se refiere a la extracción física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento por cirugía incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía microscópica controlada (cirugía de Mohs). Se contempla además que la presente invención pueda utilizarse junto con la extracción de cánceres superficiales, precánceres o cantidades ocasionales de tejido normal.

Tras la extirpación de parte o de todas las células cancerosas, el tejido o el tumor, puede formarse en el cuerpo una cavidad. El tratamiento puede llevarse a cabo por perfusión, inyección directa o aplicación local en el área de una terapia adicional contra el cáncer. Tal tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas, o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser también de dosis variables.

f. Otros agentes

Se contempla que para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento puedan utilizarse otros agentes en combinación con la presente invención. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que afectan la regulación por incremento de los receptores de la superficie celular y las uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular o agentes que aumenten la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores apoptóticos. Los agentes inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral; interferón alfa, beta y gamma; IL-2 y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocina; o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES y otras quimiocinas. Se contempla además que la regulación por incremento de los receptores de superficie celular o sus ligandos tales como Fas / ligando de Fas, DR4 o DR5 / TRAIL, potenciarían las capacidades de inducción apoptótica de la presente invención mediante el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino sobre las células hiperproliferativas. El aumento de la señalización intracelular elevando el número de uniones GAP aumentaría los efectos anti hiperproliferativos de la población celular hiperproliferativa contiguas. En otras realizaciones, pueden utilizarse agentes citostáticos o de diferenciación en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia anti hiperproliferativa de los tratamientos. Para mejorar la eficacia de la presente invención se contemplan inhibidores de la adhesión celular. Los ejemplos de inhibidores de la adhesión celular son los inhibidores de la quinasa de adhesión focal (las FAK) y Lovastatina. Se contempla además que para mejorar la eficacia del tratamiento puedan utilizarse en combinación con la presente invención otros agentes que aumentan la sensibilidad a la apoptosis de una célula hiperproliferativa, tal como el anticuerpo c225.

También puede utilizarse junto con la presente invención la terapia hormonal o puede combinarse con cualquier otra terapia contra el cáncer descrita anteriormente. El uso de hormonas puede emplearse en el tratamiento de determinados cánceres tales como cáncer de mama, de próstata, de ovario o de cuello uterino, para reducir el nivel, o bloquear, los efectos de determinadas hormonas tales como la testosterona o el estrógeno. Este tratamiento a menudo se utiliza en combinación con al menos otra terapia contra el cáncer como una opción de tratamiento o para reducir el riesgo de metástasis.

Inhibidores de la ADN metiltransferasa y/o de la histona desacetilasa. Los inhibidores de la ADN metiltransferasa ejemplares incluyen, por ejemplo, 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, 1-beta-D-arabinofuranosil-5-azacitosina y dihidro-5-azacitidina. Los inhibidores de las HDAC ejemplares incluyen ácidos hidroxámicos, tales como tricostatina A; tetrapéptidos cíclicos (tales como trapoxina B) y los depsipéptidos; benzamidas; cetonas electrófilas; y los compuestos de ácido alifático tales como fenilbutirato y ácido valproico.

g. Reguladores de la muerte celular programada

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso esencial para el desarrollo embrionario normal, que mantiene la homeostasis en tejidos adultos y suprime la carcinogénesis (Kerr *et al.*, 1972). La familia de proteínas Bcl-2 y las proteasas similares a ICE han demostrado en otros sistemas ser importantes reguladores y efectores de la apoptosis. La proteína Bcl-2, descubierta en asociación con el linfoma folicular, desempeña un papel importante en el control de la apoptosis y en la potenciación de la supervivencia celular en respuesta a diversos estímulos apoptóticos (Bakhshi *et al.*, 1985; Cleary y Sklar, 1985; Cleary *et al.*, 1986; Tsujimoto *et al.*, 1985; Tsujimoto y Croce, 1986). La proteína evolutivamente conservada Bcl-2 se reconoce ahora como un miembro de una familia de proteínas relacionadas, que pueden categorizarse como agonistas o antagonistas de la muerte.

De forma posterior a este descubrimiento se ha demostrado que Bcl-2 actúa suprimiendo la muerte celular desencadenada por una diversidad de estímulos. Además, ahora es evidente que existe una familia de proteínas Bcl-2 reguladoras de muerte celular que comparten homologías estructurales y de secuencia comunes. Se ha

demostrado que estos distintos miembros de la familia tienen funciones similares a Bcl-2 (por ejemplo, Bcl_{XL}, Bcl_w, Bcl_s, Mcl-1, A1, Bfl-1) o que contrarrestan la función de Bcl-2 y estimulan la muerte celular (por ejemplo, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

5 h. Inhibidores angiogénicos

Determinados aspectos descritos en el presente documento pueden referirse a la administración de radicales de direccionamiento acoplados operativamente a agentes angiogénicos, tales como angiotensina, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores del activador de plasminógeno, inhibidores de la metaloproteinasa tisular, interferones, interleucina 12, factor plaquetario 4, IP-10, Gro-β, trombospondina, 2-metoxioestradiol, proteína relacionada con proliferina, carboxiamidotriazol, CM101, Marimastat, polisulfato de pentosán, angiopoyetina 2 (Regeneron), interferón alfa, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina de 16K, Linomida, talidomina, pentoxifilina, genisteina, TNP-470, endostatina, paclitaxel, accutina, angiostatina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, factor plaquetario 4 o minociclina.

La proliferación de células tumorales está basada en gran medida en una extensa vascularización del tumor que acompaña la progresión del cáncer. Por lo tanto, la inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos con agentes antiangiogénicos y la destrucción dirigida de los vasos sanguíneos existentes, se ha introducido como una estrategia eficaz y relativamente no tóxica para el tratamiento del tumor. (Arap *et al.*, 1998, Arap *et al.*, 1998; Ellerby *et al.*, 1999). Se conoce una diversidad de agentes antiangiogénicos y/o de inhibidores de los vasos sanguíneos (por ejemplo, Folkman, 1997; Eliceiri y Cheresch, 2001).

i. Agentes citotóxicos

Para tratar diversas enfermedades, incluido el cáncer, pueden utilizarse agentes quimioterapéuticos (citotóxicos). Los agentes quimioterapéuticos (citotóxicos) de posible uso incluyen, pero sin limitación, 5-fluorouracilo, bleomicina, busulfán, camptotecina, carboplatino, clorambucilo, cisplatino (CDDP), ciclofosfamida, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, agentes de unión al receptor de estrógeno, etopósido (VP16), inhibidores de la proteína farnesil transferasa, gemcitabina, ifosfamida, mecloretamina, melfalán, mitomicina, navelbina, nitrosourea, plicomicina, procarbazona, raloxifeno, tamoxifeno, taxol, temozolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, vinblastina y metotrexato, vincristina, o cualquier análogo o variante derivada de los anteriores. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos entran en las categorías de agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, hormonas corticoesteroides, inhibidores mitóticos y nitrosoureas, agentes hormonales, agentes diversos y cualquier análogo o variante derivada de los mismos.

Los agentes quimioterapéuticos y los métodos de administración, dosificaciones, etc., son muy conocidos para los expertos en la materia (véase por ejemplo, el "Physicians Desk Reference", "The Pharmacological Basis of Therapeutics" de Goodman y Gilman, y en "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª ed., pág. 1035-1038 y 1570-1580), y pueden combinarse con la invención a la vista de las divulgaciones del presente documento. De forma necesaria se producirán algunas variaciones en la dosificación dependiendo del estado del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Por supuesto, todas las dosificaciones y agentes descritos en el presente documento son ejemplares en lugar de limitativos, y el experto en la materia puede utilizar otras dosis y agentes para un paciente o aplicación concretos. También se espera que sea de uso como define en el presente documento cualquier dosis entre estos puntos o intervalo derivable de ellos.

j. Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes son fármacos que interactúan de forma directa con el ADN genómico para impedir la proliferación celular. Esta categoría de fármacos quimioterapéuticos representa agentes que afectan todas las fases del ciclo celular, es decir, no son específicos de fase. Un agente de alquilación puede incluir, pero sin limitación, una mostaza nitrogenada, un etilenimeno, una metilmelanimina, un alquilsulfonato, una nitrosourea o una triazina. Incluyen, pero sin limitación: busulfán, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida (citoxano), dacarbazina, ifosfamida, mecloretamina (mustargen) y melfalán.

k. Antimetabolitos

Los antimetabolitos alteran la síntesis de ADN y ARN. A diferencia de los agentes alquilantes, afectan específicamente al ciclo celular durante la fase S. Los antimetabolitos pueden diferenciarse en diversas categorías tales como análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina y análogos de purina, y compuestos inhibidores relacionados. Los antimetabolitos incluyen, pero sin limitación, 5-fluorouracilo (5-FU), citarabina (Ara-C), fludarabina, gemcitabina y metotrexato.

I. Productos naturales

Productos naturales en general se refiere a compuestos aislados originalmente a partir de una fuente natural e identificados como que tienen una actividad farmacológica. Tales compuestos, análogos y derivados de los mismos pueden aislarse a partir de una fuente natural, sintetizarse de químicamente o producirse de forma recombinante mediante cualquier técnica conocida para los expertos en la materia. Los productos naturales incluyen categorías tales como inhibidores mitóticos, antibióticos antitumorales, enzimas y modificadores de la respuesta biológica.

Los inhibidores mitóticos incluyen alcaloides vegetales y otros agentes naturales que pueden inhibir la síntesis de proteínas, necesaria para la división celular o la mitosis. Funcionan durante una fase concreta durante el ciclo celular. Los inhibidores mitóticos incluyen, por ejemplo, docetaxel, etopósido (VP16), tenipósido, paclitaxel, taxol, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

Los taxoides son una clase de compuestos relacionados aislados de la corteza del fresno, *Taxus brevifolia*. Los taxoides incluyen, pero sin limitación, compuestos tales como docetaxel y paclitaxel. El paclitaxel se une a la tubulina (en un lugar distinto del utilizado por los alcaloides de la vinca) y estimula el ensamblaje de los microtúbulos.

Los alcaloides de la vinca son un tipo de alcaloide vegetal identificado por tener una actividad farmacéutica. Incluyen compuestos tales como la vinblastina (VLB) y la vincristina.

m. Antibióticos

Determinados antibióticos tienen tanto actividad antimicrobiana como citotóxica. Estos fármacos también interfieren con el ADN inhibiendo químicamente las enzimas y la mitosis, o modificando las membranas celulares. Estos agentes no son específicos de fase por lo que trabajan en todas las fases del ciclo celular. Los ejemplos de antibióticos citotóxicos incluyen, pero sin limitación, bleomicina dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina (Adriamicina), plicamicina (mitramicina) e idarubicina.

n. Agentes diversos

Los agentes citotóxicos diversos que no están incluidos en las categorías anteriores incluyen, pero sin limitación, complejos de coordinación de platino, antracenedionas, ureas sustituidas, derivados de metilhidrazina, amsacrina, L-asparaginasa y tretinoína. Los complejos de coordinación de platino incluyen compuestos tales como carboplatino y cisplatino (*cis*-DDP). Una antracenediona ejemplar es mitoxantrona. Una urea sustituida ejemplar es hidroxiurea. Un derivado de metilhidrazina ejemplar es procarbazona (N-metilhidrazina, MIH). Estos ejemplos no son limitativos y dentro del ámbito de la divulgación se contempla que pueda unirse a los péptidos de direccionamiento cualquier agente citotóxico, citostático o citocida conocido, y administrarse a un órgano, tejido o tipo celular que se tiene como objetivo.

VIII. Kits

Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento pueden estar comprendidas en un kit. En un ejemplo no limitativo pueden estar comprendidas en un kit células modificadas que comprenden los receptores quiméricos de citocina y/o reactivos para generar tales células. Tales reactivos incluyen uno o más de células, vectores de ácido nucleico, tampones, nucleótidos, oligonucleótidos y etcétera. Los kits comprenderán cualquiera de sus componentes en uno o más más envases adecuados.

Los componentes de los kits pueden estar empaquetados ya sea en un medio acuoso o en una forma liofilizada. Los medios de envasado de los kits en general incluirán al menos un vial, tubo de ensayo, frasco, botella, jeringa u otros medios de envasado, en los que un componente pueda colocarse y, preferentemente, alicuotarse de forma adecuada. Cuando haya más de un componente en el kit, el kit también contendrá en general un segundo, tercero u otro envase adicional, dentro del cual puedan colocarse de forma separada los componentes adicionales. Sin embargo, diversas combinaciones de los componentes pueden estar comprendidas en un vial. Normalmente, los kits descritos en el presente documento también incluirán un medio para contener los componentes en confinamiento cerrado para la venta comercial. Tales envases pueden incluir recipientes plásticos de inyección o moldeados por soplado en que están retenidos los viales deseados. Los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo (o polvos) seco. Cuando se proporcionan reactivos y/o componentes como un polvo seco, el polvo puede reconstituirse por la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también puede proporcionarse en otro medio de contención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar aspectos preferentes de la divulgación. El experto en la materia debe apreciar que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas que los inventores descubrieron que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen modos preferentes para su práctica.

Ejemplo 1**INVERSIÓN DE LOS EFECTOS DEL MICROENTORNO TUMORAL UTILIZANDO RECEPTORES QUIMÉRICOS DE CITOCINA**

5 El cáncer de páncreas sigue siendo la cuarta causa más común de mortalidad por cáncer en los países desarrollados. Las manifestaciones clínicas se desarrollan tarde y la enfermedad metastatiza de forma temprana, y las tasas de incidencia y mortalidad se han mantenido casi idéntica durante >50 años (Sweeney *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2009). Por lo tanto, son necesarias estrategias de tratamiento mejoradas a base de la comprensión de la biología de la enfermedad. Los antígenos asociados a tumor (AAT) expresados por las células malignas pueden ser inmunogénicos y, por lo tanto, dianas potenciales para la destrucción inmunitaria (Tassi *et al.*, 2008; Han *et al.*, Rong *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008; Plate, 2007). La transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos (los CTL) específicos de AAT expandidos *in vitro* puede tratar tumores de forma eficaz, incluyendo el Linfoma de Hodgkin y el melanoma (Bollard *et al.*, 2007; Morgan *et al.*, 2006). Aunque la infusión de los CTL que se dirigen a AAT expresados por el cáncer de páncreas tiene potencial terapéutico, esos tumores utilizan múltiples mecanismos de evasión inmunitaria, incluyendo la regulación por disminución de la expresión de antígenos y la liberación de citocinas inmunomoduladoras solubles y de otras sustancias que propician el desarrollo de una respuesta inmunitaria de tipo Th2 en lugar una de tipo Th1 citotóxica (Leen *et al.*, 2007; Selcean *et al.*, 2009; Formentini *et al.*, 2009; Kornmann *et al.*, 1999; Prokopchuk *et al.*, 2005; Seruga *et al.*, 2008).

20 Para superar estas barreras y desarrollar una estrategia inmunoterapéutica eficaz frente al cáncer de páncreas, las realizaciones de la invención se refieren a la generación de líneas de CTL que se dirigen a antígenos expresados en células malignas, y el diseño técnico de estos CTL para expresar moléculas quiméricas que contienen los exodominios de unión a citocina del receptor de IL13 α (IL13R α 1) y el ILR4 α unidos a los endodominios de IL2R γ e IL7R α , que transmiten las señales de Th1 (Formentini *et al.*, 2009; Prokopchuk *et al.*, 2005). En realizaciones específicas de la invención, estas manipulaciones hacen a los CTL resistentes al microentorno tumoral polarizador a Th2 y, en cambio, sostienen la señalización de Th1 para los CTL dirigidos a los AAT (Vera *et al.*, 2009). Se puede comenzar examinando muestras de biopsia y de suero de pacientes con cáncer, tal como pacientes de cáncer de páncreas, y documentar el patrón de expresión de los AAT y los niveles y patrón de las citocinas de Th2 producidas. Después se puede determinar si se pueden expandir los CTL procedentes de CMSP del paciente dirigidos frente a los antígenos expresados y los efectos de modificarlos de forma que permanezcan polarizados hacia una actividad de Th1, incluso en el microentorno tumoral inductor de Th2. En aspectos descritos en el presente documento, pueden generarse células T reactivas frente a antígenos asociados a cáncer de páncreas procedentes de CMSP del paciente y modificarse para conservar la función de Th1 incluso en el entorno de citocinas de Th2 del tumor. Tales aspectos pueden caracterizarse mediante tres estrategias ejemplares: 1) documentar el patrón de expresión de los AAT y evaluar el perfil de citocinas de las muestras de biopsia primaria; 2) generar CTL reactivos para el tumor específicos para múltiples antígenos diana asociados con cáncer de páncreas y evaluar su especificidad y función *in vitro*; y 3) proteger a los CTL de los efectos inhibidores de la señalización con las citocinas de Th2 mediante la expresión forzada de receptores quiméricos de citocina.

ANTECEDENTES E IMPORTANCIA

45 Cáncer de páncreas. El cáncer de páncreas provoca en el mundo 213.000 muertes anuales estimadas (Wong *et al.*, 2009). La extirpación quirúrgica sigue siendo la única terapia curativa, dando como resultado un tasa de supervivencia a 5 años del 15-20 %, pero esta opción no está disponible para la mayoría de las personas a las que se ha diagnosticado enfermedad localmente avanzada o metastásica (Sweeney *et al.*, 2009; Tanis *et al.*, 2009). La quimioterapia y la radioterapia convencional rara vez producen un beneficio sustancial, lo que subraya la necesidad de nuevos tratamientos.

50 Inmunoterapia adoptiva para neoplasias asociadas a virus. Los inventores han generado de forma rutinaria CTL específicos para virus para la transferencia adoptiva (Leen *et al.*, 2006; Leen *et al.*, 2009) y los estudios en >100 receptores de células madre han mostrado que los CTL-VEB obtenidos de donante pueden proteger de forma segura a los pacientes frente a los linfomas dirigidos por VEB y curar pacientes incluso con una enfermedad establecida voluminosa (Heslop *et al.*, 2009; Heslop *et al.*, 1996; Rooney *et al.*, 1995). Esta estrategia también se ha mostrado satisfactoria en el tratamiento de tumores VEB+ en individuos inmunocompetentes (Bollard *et al.*, 2007; Louis *et al.*, 2009; Straathof *et al.*, 2005; Bollard *et al.*, 2004). En un ensayo en fase I reciente, 9/10 pacientes tratados en remisión de LH por VEB+ o LNH de alto riesgo permanecieron en remisión, mientras que 5/6 con enfermedad recidivante activa tenían una respuesta tumoral, la cual era completa en 4 (Bollard *et al.*, 2007). Estos estudios demostraron que la frecuencia de las células T específicas para VEB aumentó en la sangre de los pacientes tras la infusión (lo que implica expansión *in vivo*), las células se dirigieron a los tejidos tumorales y eliminaron las células tumorales.

65 Inmunoterapia adoptiva para neoplasias independientes de virus. Los esfuerzos para sacar provecho de los CTL transferidos de forma adoptiva para el tratamiento del cáncer independiente de virus se han visto entorpecidos por (i) la limitada información con respecto a los AAT, (ii) la falta de métodos reproducibles para generar líneas de CTL dirigidos frente a los antígenos expresados, dado que las células T reactivas circulantes a menudo se vuelven

- anérgicas y presentan tolerancia inducida, y (iii) las estrategias de evasión inmunitaria que emplea el tumor, que limitan la actividad *in vitro* de las células T transferidas de forma adoptiva. Estos incluyen la regulación por disminución de los antígenos diana expresados y la secreción de citocinas inhibitoras que sirven para reunir células inmunitarias reguladoras e inhibir de forma directa y/o repolarizar las células T Th1 citotóxicas hacia un fenotipo Th2
- 5 ineficaz (Selcean *et al.*, 2009; Formentini *et al.*, 2009; Prokopchuk *et al.*, 2005). Los inventores han desarrollado estrategias para reactivar células T anérgicas/que presentan tolerancia inducida utilizando células presentadoras de antígeno (las CPA) optimizadas y potenciando citocinas para producir AAT-CTL (Kaka *et al.*, 2009; Foster *et al.*, 2007; Kaka *et al.*, 2008).
- 10 Los inventores proporcionan a continuación estrategias para identificar dianas expresadas por el cáncer de páncreas y modular la respuesta a las citocinas presentes en el microentorno tumoral de los AAT-CTL generados *in vitro*; estas estrategias se desarrollan para tener como objetivo el cáncer de páncreas utilizando inmunoterapia adoptiva.
- 15 Determinación del patrón de expresión de AAT. Ha habido informes limitados sobre los AAT expresados por el cáncer de páncreas en muestras de biopsia. Por lo tanto, se puede documentar exhaustivamente la expresión de los AAT en cáncer de páncreas utilizando por ejemplo inmunohistoquímica (IHQ) y RT-PCR.
- 20 Generación de CTL específicos para AAT *in vitro*. Los inventores han desarrollado protocolos para generar AAT-CTL procedentes de CMSP del paciente, utilizando como CPA las CD que expresan el antígeno entero (pepmix o plásmidos que codifican AAT) y cocultivando en un cóctel de citocinas óptimo (Tabla 1). Se puede determinar si esta estrategia puede aplicarse a la generación de AAT-CTL que se dirigen a antígenos asociados con cáncer de páncreas.
- 25 Superación de las estrategias de evasión inmunitaria del tumor. Para una inmunoterapia eficaz, las estrategias de evasión inmunitaria del tumor deben caracterizarse y eludirse. Las IL13 e IL14 hacen una contribución importante a la inhibición y repolarización de las células T efectoras Th1, decisivas para la eliminación tumoral en el cáncer de páncreas (Formentini *et al.*, 2009; Prokopchuk *et al.*, 2005). Se puede caracterizar la proporción de un receptor quimérico de citocina a los AAT-CTL, que se une a estas citocinas inhibitoras y convierte sus efectos intracelulares a una señal de Th1, mejorando así la eficacia de los CTL.
- 30

RESULTADOS EJEMPLARES

- 35 Detección de AAT en muestras de biopsia de cáncer. Para modelar inicialmente la estrategia, se obtuvieron cortes de ganglios linfáticos de 4 µm incluidos en parafina de pacientes con enfermedad de Hodgkin o linfoma folicular de células T del Dep. de Patología en el TCH, The Methodist Hospital y del Grupo de Oncología Pediátrica. Los cortes se desparafinizaron y rehidrataron. Para la recuperación del antígeno se utilizaron Triton-X-100 y Digest ALL1 (Zymed). Los cortes se tiñeron con los anticuerpos primarios para MAGE-A4, PRAME y Survivina. La expresión del antígeno se detectó de forma satisfactoria con (i) powervision+kit (inmunovisión) para anticuerpos primarios de conejo o ratón o (ii) el kit ABC (vector labs) para otros anticuerpos primarios. Todos los anticuerpos se validaron utilizando portaobjetos de los controles positivo y negativo, y una matriz de tejido con tejido no canceroso.
- 40

- 45 Generación de AAT-CTL con especificidad simultánea por múltiples AAT utilizando CPA tratadas con pulsos de pepmix o nucleotransfectadas con plásmido. Los inventores optimizaron el protocolo de generación de CTL utilizando como CPA CD tratadas con pulsos de una mezcla maestra de pepmix que abarca los antígenos ejemplares asociados a linfoma SSS2, Survivina y MAGEA4, y se cocultivó en presencia de IL7 (10 ng/ml), IL12 (10 ng/ml), IL15 (10 ng/ml) e IL6 (1000 U/ml) (Tabla 1).

Grupo	Polarización a Th1	Proliferación/supervivencia	Inhibe Treg
1	IL-12	IL7; IL-15	
2	IL-12	IL7; IL-15	IL-6
3	IL-12, IL-27	IL7; IL-15	
4	IL-12, IL-27	IL7; IL-15	IL-6

- 50 Los AAT-CTL se generaron con especificidad simultánea frente a los tres tipos de antígenos estimuladores. Notablemente, los CTL generados procedentes del mismo donante utilizando los mismos antígenos, pero cultivados utilizando combinaciones de citocinas subóptimas (Tabla 1: Grupos 1, 3, 4) produjeron CTL mono-específicos dirigidos frente al antígeno inmunodominante SSS2, demostrando así la utilidad de optimizar combinaciones de citocinas para generar los CTL-multiMT, en al menos determinados aspectos descritos en el presente documento. La consistencia y robustez del sistema se confirmó generando multiMT-CTL de 6/6 donantes, utilizando las CD nucleotransfectadas con plásmidos de ADN que codificaban SSS2, Survivina y MAGEA4. Los inventores también generaron CTL-multiAAT que se dirigían de forma simultánea a los antígenos expresados en leucemia WT1, PRAME, survivina y Proteinasa 3 (n=3) así como los antígenos ejemplares expresados en carcinoma hepatocelular MAGE1, MAGE3 y AFP (n=3). Estos CTL-multiAAT eran funcionales, como se evaluó mediante ELISpot de IFNγ y
- 55

ensayos de citotoxicidad. Se puede aplicar esta tecnología a la generación de CTL-multiAAT que se dirigen a los antígenos más frecuentemente expresados en cáncer de páncreas.

Para invertir los efectos de la señalización de Th2 en los CTL y asegurar la exposición a estas citocinas, en su lugar se sostiene una respuesta de tipo Th1

Diseño técnico de 2 construcciones retrovíricas intermedias y análisis preliminar en los CTL transgénicos. Se ha informado que las citocinas de Th2 IL4 e IL13, que se unen a receptores con componentes compartidos, suprimen la inmunidad de Th1 en sujetos con cáncer de páncreas (Formentini *et al.*, 2009; Prokopchuk *et al.*, 2005). El receptor de IL13 está compuesto de la cadena IL4R α y la cadena IL-13R α 1. La citocina IL13 se une con baja afinidad a la cadena IL13 α 1, después incorpora la cadena IL4R α para aumentar la afinidad de unión. Por el contrario, IL4 se une en primer lugar a IL4R α , que después incorpora la cadena IL13R α 1 o la IL2R γ c (FIG. 1). Las señales procedentes de ambos complejos receptores se transducen mediante la cadena IL4R α , de forma que tanto IL4 como IL13 incorporan la misma ruta transductora de la señal de Janus quinasa (JAK) y activadora de la transcripción (Stat6). En consecuencia, la exposición a cualquier de las dos citocinas tiene consecuencias inmunoinhibidoras solapantes (Formentini *et al.*, 2009; Prokopchuk *et al.*, 2005). Para contrarrestar estos efectos sobre los AAT-CTL de Th1, los inventores construyeron dos vectores retrovíricos de primera generación ejemplares. Como se presenta en la FIG. 2A, la construcción n.º 1 codifica una proteína de fusión del exodominio de IL13R α 1 con el endodominio de IL2R γ (IL-13R α 1/IL-2R γ) unidos a la GFP a través de un IRES. La construcción n.º 2 codifica una fusión del exodominio de IL4R α y el endodominio de IL7R α (IL-4R α /IL-7R α) unidos a mOrange. Por lo tanto, en realizaciones específicas de la invención las células que coexpresan ambas construcciones inducen una señal intracelular de Th1 tras el reconocimiento de la citocina IL4 o IL13. Para evaluar la eficacia de la transducción retroviral se evaluó la expresión de GFP o mOrange en los CTL específicos de antígeno transducidos de forma doble. Como se esperaba, esto dio como resultado una población mixta de CTL que expresaban ya sea la construcción n.º 1 (GFP positiva - cuadrante inferior derecho), construcción n.º 2 (mOrange positiva - cuadrante superior izquierdo) o doble positivos (GFP/mOrange – cuadrante superior derecho) (FIG. 2B). La función de los transgenes se confirmó midiendo la fosforilación de Stat5 tras la exposición a IL2 (50 U/ml), IL-4 (1000 U/ml) o IL13 (5 ng/ml). Fosfo Stat5 se detectó en las células de control solo tras la administración de IL2; por el contrario fosfo Stat5 se detectó en las células transgénicas que coexpresaban ambas construcciones tras la exposición a cualquiera de las 3 citocinas (FIG. 2C). Utilizando análisis por microscopía se confirmó que estas citocinas actuaban como factores de crecimiento (FIG. 2D).

DISEÑO Y MÉTODOS EXPERIMENTALES EJEMPLARES

El cáncer de páncreas es una enfermedad agresiva con mal pronóstico. Aunque existe evidencia de una inmunidad de células T específicas de tumor (Tassi *et al.*, 2008; Rong *et al.*, 2009; Plate, 2007; Alters *et al.*, 1997; Cappello *et al.*, 2009; Lepoisto *et al.*, 2008; Kawaoka *et al.*, 2008; Kondo *et al.*, 2008), las citocinas inmunosupresoras del entorno tumoral parecen limitar la eficacia de las células T (Selcean *et al.*, 2009; Formentini *et al.*, 2009; Kornmann *et al.*, 1999; Prokopchuk *et al.*, 2005). En aspectos concretos descritos en el presente documento, la infusión de AAT-CTL expandidos *ex vivo*, que se han (i) cultivado en citocinas polarizantes a Th1 para una anergia invertida, (ii) seleccionado como específicos para múltiples AAT para minimizar el escape a través de la pérdida de epítipo y (iii) hecho resistentes a factores solubles inhibidores presentes *in vivo*, produce beneficio clínico y ofrece una opción terapéutica nueva para el cáncer de páncreas.

En una primera estrategia se puede hacer lo siguiente: a) evaluar el perfil de citocinas de los tumores de páncreas y b) documentar su patrón de expresión de AAT. Se puede establecer el patrón de las citocinas de Th1 y Th2/inhibidoras en los sueros de los pacientes así como las citocinas liberadas en las muestras de tumor primario cultivadas, determinar el patrón de expresión de los AAT en biopsias utilizando IHQ y RT-PCR, por ejemplo, y generar un banco de plásmidos de ADN que codifican los antígenos más frecuentemente expresados, para su uso en los protocolos de estimulación de CTL descritos a continuación. Los datos procedentes de esta estrategia permiten del diseño de células T para inmunoterapia adoptiva que pueden dirigirse a antígenos tumorales y hacerse resistentes a la inhibición tumoral.

Los métodos ejemplares son los siguientes. Análisis de citocinas. Se puede documentar el perfil de citocinas de, por ejemplo, 30-50 muestras de bancos de sueros de pacientes y compararlas con el suero recogido de, por ejemplo, 30 donantes sanos, utilizando una matriz de citocinas de Th1/Th2 que detecte IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12, IL13, IFN γ , GM-CSF y TNF α ; se puede medir TGF β mediante ELISA. También se pueden recoger muestras de biopsia recientes, cultivarlas durante 4-5 días en RPMI+HuS al 5 % y analizar el sobrenadante utilizando las mismas citocinas. Esto permite la evaluación en estos pacientes del intervalo completo de citocinas inhibitoras y estimuladoras circulantes producidas por el tumor.

Expresión de AAT. Mediante IHQ y RT-PCR se pueden explorar las muestras de biopsia para la expresión de AAT, incluyendo las reivindicadas anteriormente como asociadas con el cáncer de páncreas (CEA, MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6 y telomerasa) (Han *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008) así como PRAME, MAGEA, SSX2/4, NY-ESO y Survivina.

Generación de un banco de plásmidos de ADN. Se pueden generar plásmidos que codifican los 7 antígenos (por ejemplo) más frecuentemente detectados en la exploración. Estos se pueden clonar en un plásmido de expresión p-

Max bajo el control del promotor CMV, que asegura altos niveles de expresión del transgén, y coexpresarse con GFP para permitir la evaluación de la eficacia de nucleofección. Los inventores han validado anteriormente los plásmidos de ADN como una fuente eficaz de antígeno para la generación tanto de virus (Gerdemann *et al.*, 2009) como de CTL específicos de tumor.

5 En aspectos concretos descritos en el presente documento, se detecta un predominio de citocinas de Th2/inhibidoras IL13 e IL4 en los sueros de pacientes y en el sobrenadante de biopsias cultivadas, debido a que las líneas de células pancreáticas producen a ambas en exceso y el tumor la utilizan como factores de crecimiento autocrino. En aspectos concretos descritos en el presente documento se detecta la expresión de AAT en biopsias de
10 pacientes. Los informes publicados indican que la mayoría de los tumores son positivos para ACE, aproximadamente el 60 % expresa MUC-1, mientras que MUC-6 se detecta de forma menos frecuente (<15 %), y se puede caracterizar además la frecuencia e intensidad de la expresión de AAT. Puede generarse un banco de plásmidos que expresen los AAT más frecuentemente detectados.

15 Tabla 2: Muestras de tejido ejemplares

Tejidos	Número de muestras
Células sanguíneas	232
Líquido cístico	22
Tejido normal	701
Jugo pancreático	66
Plasma	574
Suero	559
Tejido tumoral	780
Pancreatitis	178
Total	3092

Estos aspectos descritos proporcionan el perfil de AAT y la expresión de citocinas inhibitoras por parte de los tumores de páncreas, permitiendo el diseño de estrategias de direccionamiento y protectoras.

20 En una segunda estrategia, se pueden generar CTL específicos de tumor específicos para múltiples antígenos diana asociados con cáncer de páncreas, y evaluar su especificidad y función *in vitro*. Se puede determinar si los CTL dirigidos frente a los AAT de cáncer de páncreas pueden expandirse a partir de sujetos con cáncer de páncreas. Se pueden generar CTL, en primer lugar con una especificidad única y después para múltiples antígenos, a base del
25 éxito en otros cánceres, con la intención de minimizar la evasión inmunitaria mediada por las variantes de pérdida de antígenos tumorales.

Los métodos ejemplares son los siguientes: Se pueden obtener, por ejemplo, 40-50 ml de sangre del paciente que serán una fuente de las CPA y de linfocitos T respondedores. Se pueden generar líneas de CTL a partir de, por
30 ejemplo, 20-25 pacientes.

Generación de CD: Las CD se diferencian a partir de monocitos seleccionados por CD14 mediante el cultivo en GM-CSF e IL-4 en medio Cell-Genix DC. Las células positivas para CD14 se crioconservan para la estimulación posterior. Se vuelven a madurar las CD cultivadas durante 24 h, se nucleofectan utilizando, por ejemplo, los distintos
35 plásmidos de ADN que codifican antígenos generados como se describe anteriormente, después se maduran durante 24 h adicionales. Utilizando citometría de flujo se evalúan el fenotipo y la eficacia de nucleofección, midiendo la expresión de las moléculas de maduración/coestimuladoras CD80, CD83, CD86, HLA-Dr y GFP.

Estimulación de CTL: Para la activación de las células T específicas de antígeno, las CD nucleofectadas se cocultivan con las CMSP positivas para CD14 a una proporción R:E de 10:1, en medio de CTL (Click's al 45 %, RPMI avanzado al 45 %, suero humano al 5 % y L-glutamax 5 mM), en el cóctel de citocinas optimizado (IL-7, IL-12, IL15 e IL6) (Tabla 1) para inducir la supervivencia y expansión óptimas de CTL. Para generar CTL-multiAAT se pueden transfectar CD con múltiples plásmidos de forma simultánea. Las células expandidas se reestiman el día 9 con las CD nucleofectadas y se cultivan con IL7, y dos veces a la semana con IL-2 (50 U/ml) desde el día 12. La
45 expansión y viabilidad de los CTL se evalúan por exclusión de azul de tripano. Tras 3 estimulaciones, se puede analizar el fenotipo celular utilizando marcadores que incluyen CD4, CD8, CD56, CD16, CD45RA, CD45RO, CD25, CD28, CD27 y CD62L, para determinar el estado de activación y memoria (efectora frente a memoria central) de los CTL. Utilizando ELispot o tinción de citocinas intracelulares se puede medir la producción de las citocinas de Th1 (IFN- γ , TNF α , IL2) y Th2 (IL4, IL5, IL13, IL10 y TGF β) en respuesta a la estimulación (ya sea péptidos o las CD nucleofectadas). La variedad de epítomos se evalúa mediante ELispot, por ejemplo utilizando grupos de péptidos solapantes para estimular células seleccionadas por CD4 y CD8, y se determina qué epítomos CD4 y CD8 se reconocen dentro de cada proteína. La función citolítica se evalúa mediante un ensayo de liberación de Cr⁵¹ utilizando las CPA que expresan AAT, líneas de células pancreáticas con HLA coincidente, así como tumor autólogo como células diana.
50

55

En aspectos concretos descritos en el presente documento, se producen fácilmente CTL-multiAAT policlonales a partir de CMSP de pacientes, utilizando las CD nucleofectadas como las CPA. En determinados casos, no todos los antígenos son inmunogénicos en todos los donantes, aunque en casos concretos se pueden generar de forma consistente CTL-multiAAT que reconocen al menos 2 antígenos para cada sujeto. A base de los hallazgos en las líneas de CTL, en combinación con el perfil de expresión de AAT identificado como se describe anteriormente, se pueden identificar las 4-5 dianas óptimas (por ejemplo) para la inmunoterapia futura. Las células expandidas pueden ser policlonales (CD4+ y CD8+) con poblaciones de memoria central (CD62L+) y efectora (CD62L-), y los efectores finalmente diferenciados. En presencia del cóctel de citocinas optimizado, en aspectos concretos los CTL tendrán un perfil de citocinas de Th1 y producirán TNF α , IFN γ e IL2 tras la reestimulación, permitiendo la identificación de un papel de epítomos de células T CD4+ y CD8+ para cada antígeno. En algunos aspectos las células expandidas conservan la especificidad y la actividad para todos los antígenos estimuladores, según se mide mediante, por ejemplo, citometría de flujo, tinción intracelular de citocinas y ensayos citotóxicos.

En los casos en donde puede haber un fracaso en la generación de AAT-CTL utilizando las CD nucleofectadas como las CPA, se pueden utilizar pepmix para la estimulación antigénica. En los casos donde puede haber un fracaso en la activación y expansión de forma simultánea de los CTL con especificidad de multiAAT, como para antígenos víricos, no todos los AAT son igualmente inmunogénicos y se puede observar competición antigénica y pérdida de especificidad frente a antígenos más débiles durante múltiples ciclos de estimulación. Sin embargo, la combinación optimizada de citocinas permite sostener la multiespecificidad dentro de las líneas. En los casos en donde puede haber una mala proliferación de los AAT-CTL *in vitro* (aunque esto es improbable debido a que los inventores consiguieron de forma consistente una expansión de 20-40 veces de AAT-CTL durante un periodo de cultivo de 16 días en un bioreactor G-Rex; Vera *et al.*, 2009), y además esta expansión no se mantiene, se puede sustituir la IL15 por IL2, que aumenta la proliferación sin pérdida de especificidad (Quintarelli *et al.*, 2007). En los casos en que la frecuencia de las células T reactivas esté por debajo del límite de detección del ELISpot de IFN γ y de los ensayos de tinción intracelular, aunque esto es improbable debido a que el ELISpot puede detectar tan poco como 1/100.000 células secretoras de citocina, se pueden analizar los CTL que se han estimulado de forma múltiple (y se han duplicado 7-10 veces en cada estimulación, por ejemplo); así se esperaría que la frecuencia de linfocitos T se amplifique lo suficiente para permitir la detección. Si no, se puede reestimar.

En aspectos descritos en el presente documento, se desarrolla una técnica reproducible para fabricar CTL policlonales con especificidad para múltiples epítomos dentro de múltiples antígenos tumorales expresados en el cáncer, incluyendo al menos el cáncer pancreático.

En una tercera estrategia, se pueden proteger los CTL de los efectos inhibidores de la señalización con citocinas de Th2 mediante la expresión forzada de receptores quiméricos de citocinas. En aspectos particulares, hay una generación de una construcción bicistrónica única que codifica los exodominios del IL13R α y/o IL4R α , unidos a, por ejemplo, los endodominios de IL2R γ y/o IL7R α .

Una estrategia de evasión inmunitaria tumoral empleada por el cáncer de páncreas es, por ejemplo, la liberación de citocinas inhibitorias de Th2, tales como IL13 e IL4, lo que i) potencia la proliferación de células cancerosas y ii) atenúa y repolariza los CTL Th1 específicos para AAT a células Th2. Por lo tanto, para mejorar la eficacia de los CTL-multiAAT transferidos de forma adoptiva se los puede hacer resistentes a los efectos inhibidores de IL13 e IL4 utilizando un receptor quimérico de citocina que una los exodominios de los receptores que se unen a estas citocinas de Th2, a los endodominios de señalización de dos receptores de citocinas estimuladoras (Th1).

Los métodos ejemplares son los siguientes: Los inventores ya habían preparado y analizado 2 vectores retrovíricos intermedios funcionales ejemplares; la construcción n.º 1 codifica IL-13R α 1/IL-2R γ -IRES-GFP y la construcción n.º 2 codifica IL-4R α /IL-7R α -IRES-mOrange (FIG. 2). Se incluyeron sitios de enzimas de restricción compatibles exclusivos (XhoI-MluI) para permitir el reemplazo fácil de la GFP en la construcción n.º 1 con la proteína de fusión IL-4R α /IL-7R α de la construcción n.º 2 (FIG. 2a), para producir una construcción (n.º 3) bicistrónica única que codifica los exodominios tanto del receptor IL4 como de IL13 con los receptores de IL2 e IL7 transductores de señales (FIG. 3a). Se puede validar su función mediante medios convencionales en la técnica. El sobrenadante retrovírico puede prepararse utilizando la transfección transitoria de células 293T y la transducción de CTL puede seguir protocolos publicados (Vera *et al.*, 2009; Quintarelli *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2006; Savoldo *et al.*, 2007). Se puede evaluar la expresión de las proteínas recombinantes mediante análisis de FACS para IL13R α e IL4R α , y la funcionalidad de los endodominios de IL2R γ e IL7R α mediante análisis de fosfo Stat 5 en presencia de IL2, IL4 e IL13. Después, se puede generar una línea productora de PG-13 establece que contenga las secuencias de Gag y Pol en *trans*, lo que permite la producción estable de virus. Se pueden aislar clones de células individuales y analizar sus títulos funcionales y la replicación del vector competente.

En aspectos concretos descritos en el presente documento, existe una expresión equivalente de IL13R α 1 e IL4R α , según se evalúa mediante FACS, y los endodominios de IL2R γ e IL7R α transmitirán una señal de Th1 detectable mediante análisis de fosfo Stat5. Hay una transducción por ejemplo del >20% de dianas linfocito T, y las células transducidas se seleccionan a lo largo del tiempo cultivando en IL4 o IL13 (Vera *et al.*, 2009; Bollard *et al.*, 2007; Savoldo *et al.*, 2007).

En algunos casos puede haber emparejamiento cruzado entre el exodominio de IL13R α 1 y el IL4R α de tipo silvestre, que se expresa de forma débil en los CTL, y esto podría dar como resultado una señalización de Stat6 de fondo de bajo nivel. Sin embargo, la proporción alta de expresión de receptor transgénico:de tipo silvestre disminuye la probabilidad de que esto se produzca. El emparejamiento cruzado del exodominio de IL4R α con IL2R γ de tipo silvestre también puede producirse en determinados aspectos, pero en este caso es aceptable debido que la señal de Th1 se transmitirá (FIG. 3).

En algunos aspectos descritos en el presente documento, se produce una construcción bicistrónica y una línea productora estable que permite a los CTL sostener una señal de actividad de Th1 incluso cuando se exponen a IL4 o IL13, que normalmente inducen a un cambio a Th2.

Se puede evaluar la eficacia de transducción *ex vivo* y la función de los CTL-multiAAT modificados con genes cultivados en presencia de IL13 e IL4. Esta comparación formal *in vitro* permite determinar si cada proteína de fusión se expresa de forma funcional en los CTL-multiAAT, si la expresión del transgén persiste y si tal expresión modifica el fenotipo de las células transducidas o afecta de forma adversa su actividad antitumoral.

Los métodos ejemplares son los siguientes: los CTL-multiAAT se generan por ejemplo como se describe anteriormente y se transducen por ejemplo con la construcción n.º 3. Se puede medir la expansión de las células no transducidas y de las transducidas. Los CTL que se han transducido de forma única ya sea con la construcción n.º 1 o n.º 2 pueden utilizarse como controles. Los CTL se cultivan en presencia de IL2, IL4 e IL13. Se pueden medir los cambios del fenotipo celular, los números y la viabilidad utilizando FACS y exclusión de azul de tripano, y los cambios en la señalización celular utilizando un kit de señalización de múltiples rutas. Además, la actividad antitumoral se compara utilizando como dianas las CPA autólogas que expresan AAT, líneas de células pancreáticas con HLA coincidente y células tumorales autólogas, en presencia de IL2, IL13 e IL4 en un ensayo a corto (ensayos de Cr⁵¹ de 4 h) y largo plazo (cocultivo de 4 días).

En aspectos concretos de la invención se detectan niveles funcionales de ambas proteínas de fusión y se detecta que el cultivo de los CTL no transducidos o los CTL transducidos con la construcción n.º 1 con cualquier citocina distinta de IL2 produce un efecto negativo sobre la función, proliferación y supervivencia de los CTL. En una realización concreta, los CTL transducidos con la construcción n.º 2 proliferan y mantienen su función en presencia de IL4, debido a que esta construcción quimérica ejemplar puede dimerizar con IL2R γ de tipo silvestre. Para finalizar, en realizaciones específicas de la invención los CTL transducidos con la construcción n.º 3 transmiten una señal de Th1, proliferan, sobreviven y funcionan en presencia de las tres citocinas (FIG. 3). En la Tabla 3 se muestra una tabla de resumen de los resultados ejemplares.

Tabla 3: Resultados predichos para las construcciones ejemplares

	+IL2	+IL4	+IL13
	Crecimiento/Función	Crecimiento/Función	Crecimiento/Función
No transducidos	+++	-	-
n.º 1 (IL13R α /IL2R α)	+++	-	-
n.º 2 (IL4R α /IL7R α)	+++	++	-
n.º 3 (fusión)	+++	++++	++++

En aspectos descritos en el presente documento, se desarrolla para el cáncer, tal como cáncer de páncreas, una terapia dirigida al tumor con CTL multiespecíficos, y estas células se hacen resistentes a una importante estrategia de evasión inmunitaria utilizada por el tumor. En un estudio clínico se pueden producir e infundir CTL-multiAAT modificados con genes para evaluar su seguridad y su eficacia antitumoral en individuos con cáncer de páncreas.

Ejemplo 2

MODIFICACIÓN GENÉTICA CON IL4R α /IL7R α DE CÉLULAS T MODIFICADAS CON CAR COMO EJEMPLO

Los tumores han desarrollado mecanismos complejos para subvertir la respuesta inmunitaria celular, incluyendo la expresión de FasL o de PD-L1, que induce anergia y apoptosis en las células T efectoras. Están incluidas en el microentorno la incorporación de células T reguladoras y la secreción de TGF- β y de otras citocinas inmunosupresoras que inhiben la proliferación de células T. Hay expresión constitutiva de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por parte de los tumores y de las células dendríticas reguladoras, lo que empobrece el triptófano, dando como resultado la anergia de las células T y la regulación por disminución o modulación del MHC y de moléculas coestimuladoras. Las células T pueden suprimirse mediante diversos factores presentes en el microentorno tumoral, incluyendo al menos IL10, TGF- β , IL13 e IL-4. Se puede superar este problema si se utiliza un exodominio del receptor de citocina con un endodominio no nativo para dotar a las células T para que resistan al microentorno tumoral inhibitor.

En realizaciones de la invención hay protección de los CTL-multiAAT frente a los efectos inhibidores de las citocinas de Th2 mediante la expresión forzada de un receptor de citocinas IL4/IL7 artificial. Puede producirse una construcción transgénica ejemplar, tal como una de la FIG. 4, que ilustra una fusión de IL4R α /IL7R α , e incluye un gen indicador, tal como mOrange, aunque en algunos casos la construcción carece de un gen indicador. La FIG. 5 demuestra la expresión estable del receptor transgénico detectada por citometría de flujo para la detección de la expresión de IL4R y la coexpresión de mOrange en las células transducidas. La FIG. 6 muestra que el receptor transgénico es funcional, según se evalúa mediante la detección de STAT5 fosforilado (pSTAT5) en células transgénicas tras la exposición a la citocina IL4, lo que en condiciones de tipo silvestre induciría pSTAT6. La FIG. 7 demuestra que la expresión transgénica de 4/7R quimérico no afecta de forma adversa la función de los CTL, según se evalúa utilizando un ensayo de liberación de cromo para detectar la lisis específica de células diana, y la FIG. 8 muestra que las células T transgénicas que expresan 4/7R proliferan *in vitro* en presencia de IL2 (factor de crecimiento convencional utilizado para inducir la proliferación de células T) o de IL-4, mientras que los CTL generados procedentes de los mismos donantes pero que no expresan el 4/7R tienen la capacidad de proliferar solo en presencia del factor de crecimiento IL2. La FIG. 9 muestra que los CTL que expresan 4/7R pueden empobrecer IL4 en el sobrenadante recogido de una línea tumoral, lo que indica que en efecto el receptor transgénico puede utilizar la citocina producida por el tumor y puede, de forma potencial, privar al tumor de un factor de crecimiento presente con anterioridad. La FIG. 10 muestra que los CTL que expresan 4/7R son resistentes a otras citocinas inmunosupresoras, según se evalúa mediante el recuento de células tras la exposición a las condiciones con las citocinas indicadas; la especificidad y la función de los CTL se mantuvo, según se evaluó mediante ELISpot.

Se ilustra el cambio de la señalización de una citocina inmunosupresora en un factor de crecimiento de células T (FIG. 11). Las FIG. 12-14 demuestran que los CTL 4/7R controlan el crecimiento tumoral en un modelo de ratón de xenoinjerto, en donde se injertaron ratones IDCG con un tumor productor de IL4 que coexpresa FFLuc (abreviatura de *firefly luciferase*, luciferasa de luciérnaga) para permitir la formación de imágenes *in vivo*. Posteriormente los animales se trataron con los CTL no transducidos o modificados con 4/7R. Los animales tratados con los CTL 4/7R tenían tumores significativamente más pequeños que los grupos de control, lo que dio como resultado un aumento de la supervivencia global. La FIG. 15 evalúa que en determinadas realizaciones se pueden modificar las células T obtenidas del paciente modificadas con CAR-PSCA para coexpresar por ejemplo 4/7R. La FIG. 16 muestra que las células T CAR-PSCA modificadas para coexpresar 4/7R conservan su capacidad de destruir dianas tumorales.

Este ejemplo muestra que las células T pueden modificarse para coexpresar distintos transgenes. Se confirió especificidad antigénica a las células T a través de la modificación genética con un receptor quimérico de antígeno que se dirige al antígeno tumoral ejemplar PSCA. Posteriormente, las mismas células se modificaron para coexpresar 4/7R. La modificación con 4/7R no afectó de forma adversa la capacidad de los linfocitos T para reconocer las células tumorales.

Referencias

Alters SE, Gadea JR, Philip R. Immunotherapy of cancer. Generation of CEA specific CTL using CEA peptide pulsed dendritic cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1997; 417: 519-524.

Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC *et al.* Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J.Exp.Med.* 2004; 200: 1623-1633.

Bollard CM, Gottschalk S, Leen AM *et al.* Complete responses of relapsed lymphoma following genetic modification of tumor-antigen presenting cells and T-lymphocyte transfer. *Blood* 2007; 110: 2838-2845.

Cappello P, Tomaino B, Chiarle R *et al.* An integrated humoral and cellular response is elicited in pancreatic cancer by alpha-enolase, a novel pancreatic ductal adenocarcinoma-associated antigen. *Int J Cancer* 2009; 125: 639-648.

Formentini A, Prokopchuk O, Strater J *et al.* Interleukin-13 exerts autocrine growth-promoting effects on human pancreatic cancer, and its expression correlates with a propensity for lymph node metastases. *Int.J.Colorectal Dis.* 2009; 24: 57-67.

Foster AE, Leen AM, Lee T *et al.* Autologous designer antigen-presenting cells by gene modification of T lymphocyte blasts with IL-7 and IL-12. *J Immunother* 2007; 30: 506-516.

Gerdemann U, Christin AS, Vera JF *et al.* Nucleofection of DCs to generate Multivirus-specific T cells for prevention or treatment of viral infections in the immunocompromised host. *Mol.Ther.* 2009; 17: 1616-1625.

Han L, Pansare V, Al-Abbadi M, Husain M, Feng J. Combination of MUC5ac and WT-1 immunohistochemistry is useful in distinguishing pancreatic ductal carcinoma from ovarian serous carcinoma in effusion cytology. *Diagn.Cytopathol.* 2009

- Heslop HE, Ng CYC, Li C *et al.* Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nature Medicine* 1996; 2: 551-555.
- 5 Heslop HE, Siobod KS, Pule MA *et al.* Long term outcome of EBV specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 2009
- Kaka AS, Foster AE, Weiss HL, Rooney CM, Leen AM. Using dendritic cell maturation and IL-12 producing capacity as markers of function: a cautionary tale. *J Immunother* 2008; 31: 359-369.
- 10 Kaka AS, Shaffer DR, Hartmeier R *et al.* Genetic modification of T cells with IL-21 enhances antigen presentation and generation of central memory tumor-specific cytotoxic T-lymphocytes. *J Immunother* 2009; 32: 726-736.
- Kawaoka T, Oka M, Takashima M *et al.* Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer: cytotoxic T lymphocytes stimulated by the MUC1-expressing human pancreatic cancer cell line YPK-1. *Oncol.Rep.* 2008; 20: 155-163.
- 15 Kondo H, Hazama S, Kawaoka T *et al.* Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer using MUC1 peptide-pulsed dendritic cells and activated T lymphocytes. *Anticancer Res.* 2008; 28: 379-387.
- Kornmann M, Kleeff J, Debinski W, Korc M. Pancreatic cancer cells express interleukin-13 and -4 receptors, and their growth is inhibited by *Pseudomonas* exotoxin coupled to interleukin-13 and -4. *Anticancer Res.* 1999; 19: 125-131.
- 20 Leen AM, Christin A, Myers GD *et al.* Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplant. *Blood* 2009
- 25 Leen AM, Myers GD, Sili U *et al.* Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat.Med.* 2006; 12: 1160-1166.
- 30 Leen AM, Rooney CM, Foster AE. Improving T cell therapy for cancer. *Annu. Rev.Immunol.* 2007; 25: 243265.
- Lepisto AJ, Moser AJ, Zeh H *et al.* A phase 1/11 study of a MUC1 peptide pulsed autologous dendritic cell vaccine as adjuvant therapy in patients with resected pancreatic and biliary tumors. *Cancer Ther.* 2008; 6: 955-964.
- 35 Li M, Bharadwaj U, Zhang R *et al.* Mesothelin is a malignant factor and therapeutic vaccine target for pancreatic cancer. *Mol.Cancer Ther.* 2008; 7: 286-296.
- Louis CU, Straathof K, Bollard CM *et al.* Enhancing the in vivo expansion of adoptively transferred EBV-specific CTL with lymphodepleting CD45 monoclonal antibodies in NPC patients. *Blood* 2009; 113: 24422450.
- 40 Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR *et al.* Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006; 314: 126-129.
- 45 Nakazawa Y, Huye LE, Dotti G *et al.* Optimization of the PiggyBac Transposon System for the Sustained Genetic Modification of Human T Lymphocytes. *J Immunother* 2009
- Plate JM. Current immunotherapeutic strategies in pancreatic cancer. *Surg.Oncol.Clin.N.Am.* 2007; 16: 91943, xi.
- 50 Prokopchuk O, Liu Y, Henne-Bruns D, Kornmann M. Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions. *Br.J.Cancer* 2005; 92: 921-928.
- Quintarelli C, Vera JF, Savoldo B *et al.* Co-expression of cytokine and suicide genes to enhance the activity and safety of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2007; 110: 2793-2802.
- 55 Rong Y, Jin D, Wu W *et al.* Induction of protective and therapeutic anti-pancreatic cancer immunity using a reconstructed MUC1 DNA vaccine. *BMC.Cancer* 2009; 9: 191.
- 60 Rooney CM, Smith CA, Ng C *et al.* Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995; 345: 9-13.
- Savoldo B, Rooney CM, Di SA *et al.* Epstein-Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD30zeta artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease. *Blood* 2007; 110: 2620-2630.
- 65 Seicean A, Popa D, Mocan T, Cristea V, Neagoe I. Th1 and Th2 profiles in patients with pancreatic cancer compared with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2009; 38: 594-595.

- Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat.Rev.Cancer* 2008; 8: 887-899.
- 5 Straathof KC, Bollard CM, Papat U *et al.* Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes. *Blood* 2005; 105: 1898-1904.
- Sweeney AD, Wu MF, Hilsenbeck SG, Brunicardi FC, Fisher WE. Value of pancreatic resection for cancer metastatic to the pancreas. *J.Surg.Res.* 2009; 156: 189-198.
- 10 Tanis PJ, van der Gaag NA, Busch OR, van Gulik TM, Gouma DJ. Systematic review of pancreatic surgery for metastatic renal cell carcinoma. *Br.J.Surg.* 2009; 96: 579-592.
- Tassi E, Gavazzi F, Albarello L *et al.* Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4+ T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients. *J.Immunol.* 2008; 181 : 6595-6603.
- 15 Vera J, Savoldo B, Vigouroux S *et al.* T lymphocytes redirected against the kappa light chain of human immunoglobulin efficiently kill mature B lymphocyte-derived malignant cells. *Blood* 2006; 108: 3890-3897.
- Vera JF, Brenner LJ, Gerdemann U *et al.* Accelerated production of antigen-specific T-cells for pre-clinical and clinical applications using Gas-permeable Rapid Expansion cultureware (G-Rex). *J Immunother* 2009; In press:
- 20 Vera JF, Hoyos V, Savoldo B *et al.* Genetic manipulation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes to restore responsiveness to IL-7. *Mol.Ther.* 2009; 17: 880-888.
- Voidonikolas G, Gingras MC, Hodges S *et al.* Developing a tissue resource to characterize the genome of pancreatic cancer. *World J.Surg.* 2009; 33: 723-731.
- 25 Wong HH, Lemoine NR. Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat.Rev.Gastroenterol. Hepatol.* 2009; 6: 412-422.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Una célula del sistema inmunitario que comprende un receptor quimérico de citocina que comprende un exodominio de unión a citocina y un endodominio de transducción de señales, en el que el exodominio es un exodominio del receptor de IL4 y el endodominio es un endodominio del receptor de IL7, o el exodominio es un exodominio del receptor de IL13 y el endodominio es un endodominio del receptor de IL2, en el que la célula es una célula T primaria, un linfocito T o una célula NK.
2. La célula de la reivindicación 1, en la que el exodominio es un exodominio del receptor de IL4 y el endodominio es un endodominio del receptor de IL7.
3. La célula de la reivindicación 1, en la que el exodominio es un exodominio del receptor de IL13 y el endodominio es un endodominio del receptor de IL2.
4. La célula de la reivindicación 1, en la que el linfocito T es un linfocito T citotóxico específico de antígeno tumoral de origen natural.
5. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula se dirige a un antígeno asociado a tumor seleccionado de ACE, MUC1, MUC5AC, MUC6, telomerasa, PRAME, MAGEA, SSSX2/4, NY-ESO y Survivina.
6. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la célula es un linfocito T citotóxico que es específico para múltiples antígenos asociados a tumor y en la que uno de los antígenos asociados a tumor se selecciona de ACE, MHC, CTLA-4, gp100, mesotelina, PD-L1, TRP1, CD40, EGFP, Her2, TCR alfa, trp2, TCR, MUC1, cdr2, ras, 4-1BB, CT26, GITR, OX40, TGF- α , WT1, MUC1, LMP2, E6 E7 de VPH, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE A3, p53 no mutante, NY-ESO-1, PSMA, GD2, Melan A/MART1, mutante de Ras, gp 100, mutante de p53, Proteinasa3 (PR1), bcr-abl, Tirosinasa, Survivina, PSA, hTERT, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógeno, Ciclina B1, ácido polisiálico, MYCN, RhoC, TRP-2, GD3, Fucosil GM1, Mesotelina, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, LMA por ETV6, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, PAX5, OY-TES1, proteína de Esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSSX2, XAGE 1, B7H3, Legumaina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR- β , MAD-CT-2 y antígeno relacionado con Fos 1.
7. Un método de producción de una célula T primaria, de un linfocito T o de una célula NK que comprende un receptor quimérico de citocina que comprende un exodominio de unión a citocina y un endodominio de producción de señales, en el que el exodominio es un exodominio del receptor de IL4 y el endodominio es un endodominio del receptor de IL7, o el exodominio es un exodominio del receptor de IL13 y el endodominio es un endodominio del receptor de IL2, comprendiendo el método transfectar una célula T primaria, un linfocito T o una célula NK obtenida de un individuo con un vector de expresión que codifica el receptor quimérico.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la célula T primaria, el linfocito T o la célula NK es de un individuo que necesita un tratamiento para el cáncer.
9. El método de la reivindicación 7 u 8, en el que el vector es un vector retroviral, un vector lentiviral o un plásmido transposón.
10. El método de la reivindicación 7, en el que la célula T primaria, el linfocito T o la célula NK es un linfocito T citotóxico específico de antígeno tumoral de origen natural.
11. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método para el tratamiento del cáncer en un individuo, comprendiendo el método suministrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de las células.
12. La célula para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la célula es autóloga para el individuo.
13. La célula para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la célula es alogénica para el individuo.
14. La célula para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en las que el individuo tiene un cáncer que se selecciona de cáncer de páncreas, de pulmón, de mama, de cerebro, de próstata, de piel, de ovario, de testículo, de vesícula biliar, de bazo, de estómago, de colon, de recto, de esófago, de cuello uterino, de vejiga, de endometrio, de riñón, hematológico, de tiroides y gástrico.
15. La célula para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que la célula se suministra al individuo por administración intravenosa.

FIG. 1

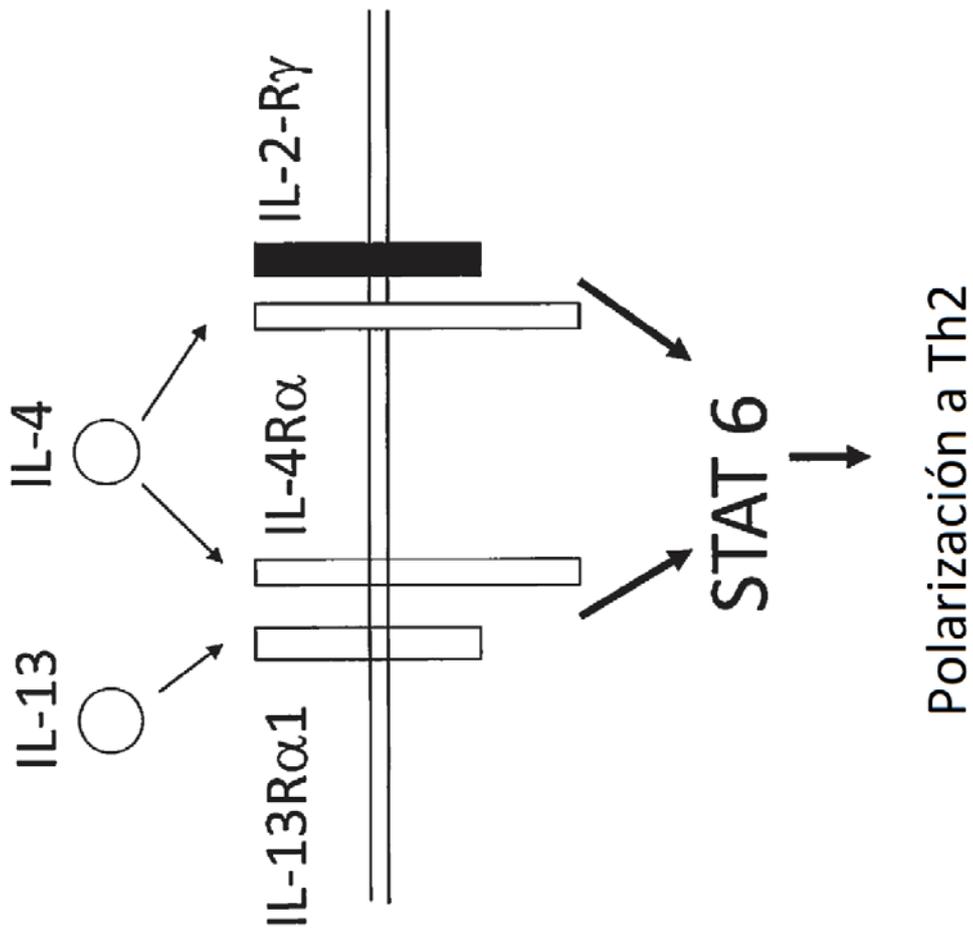


FIG. 2

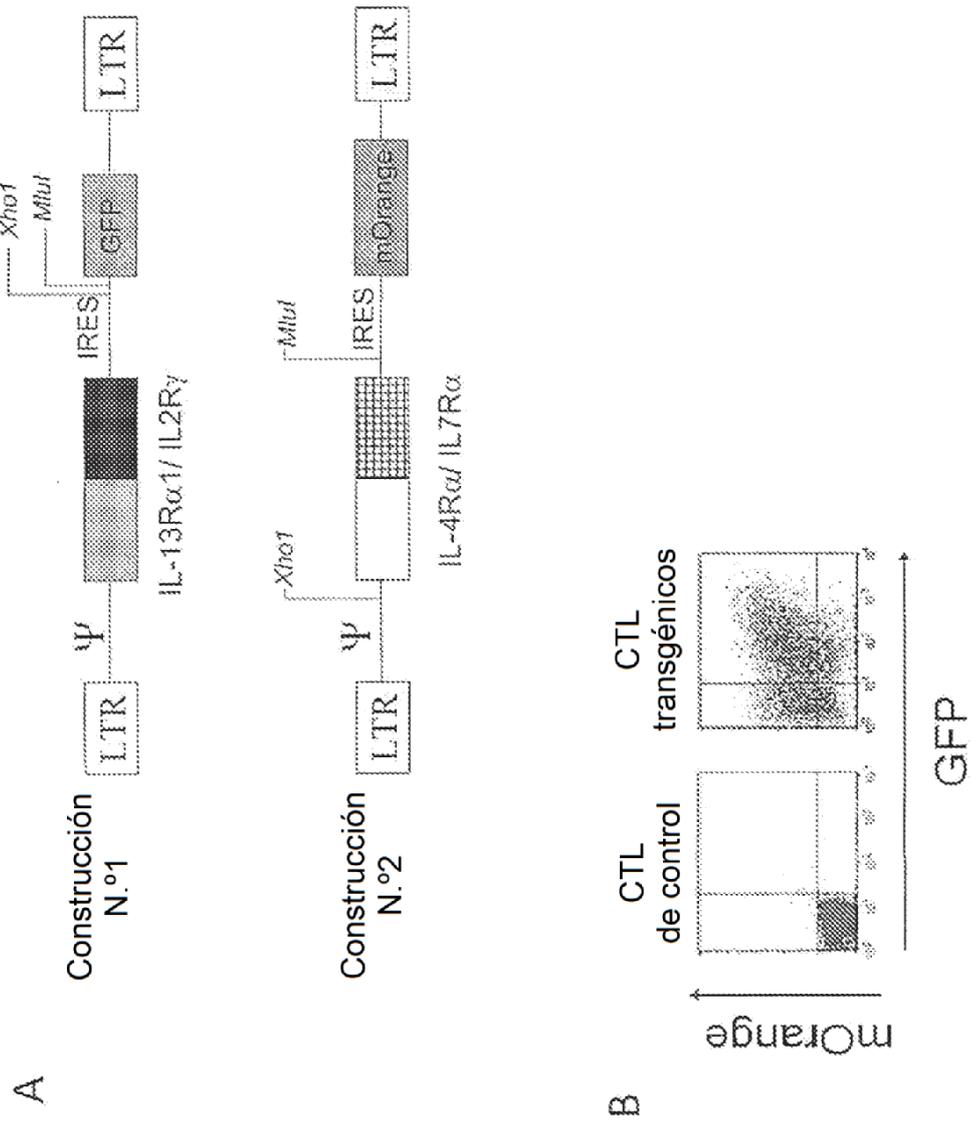


FIG. 2

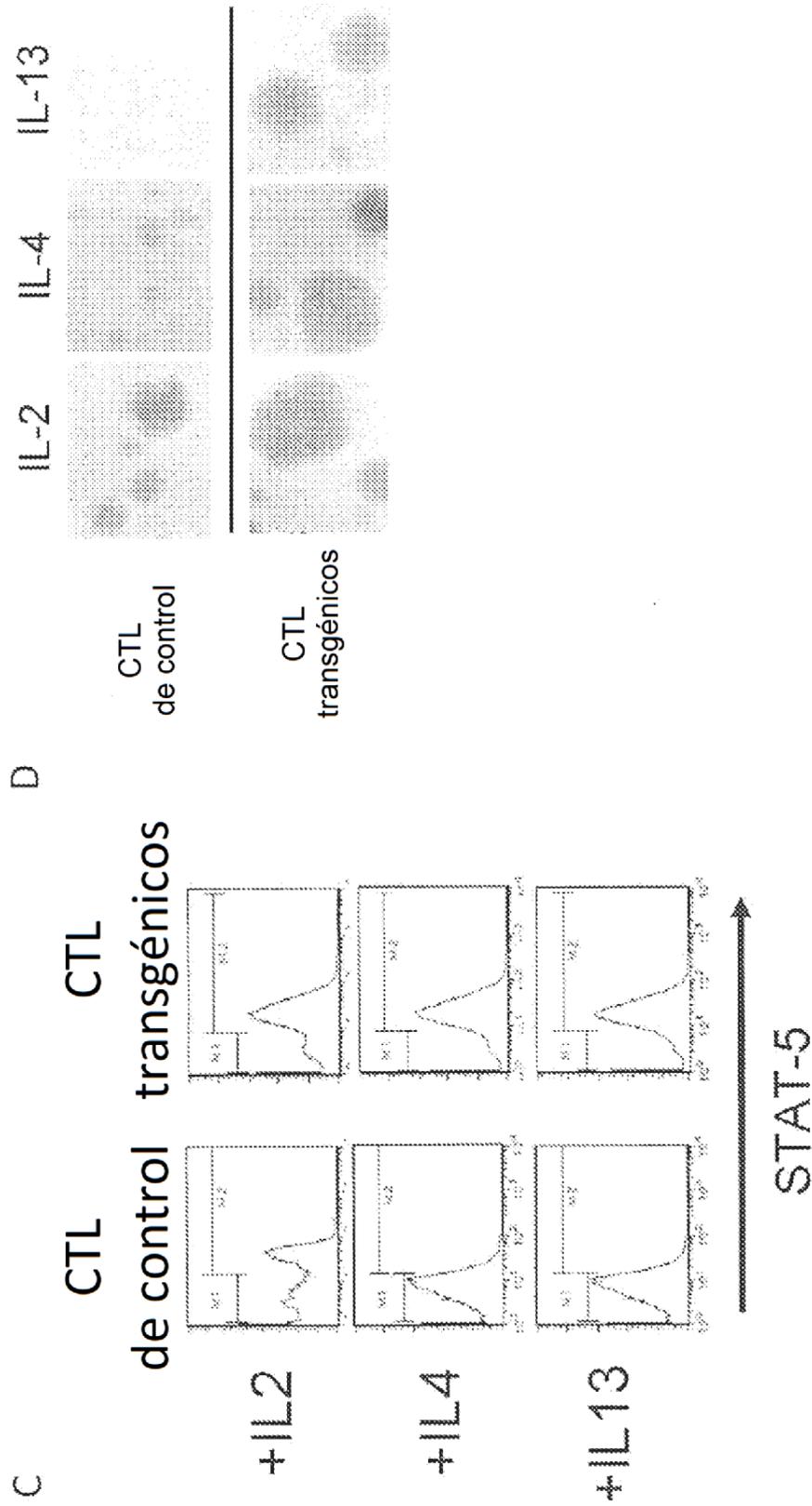
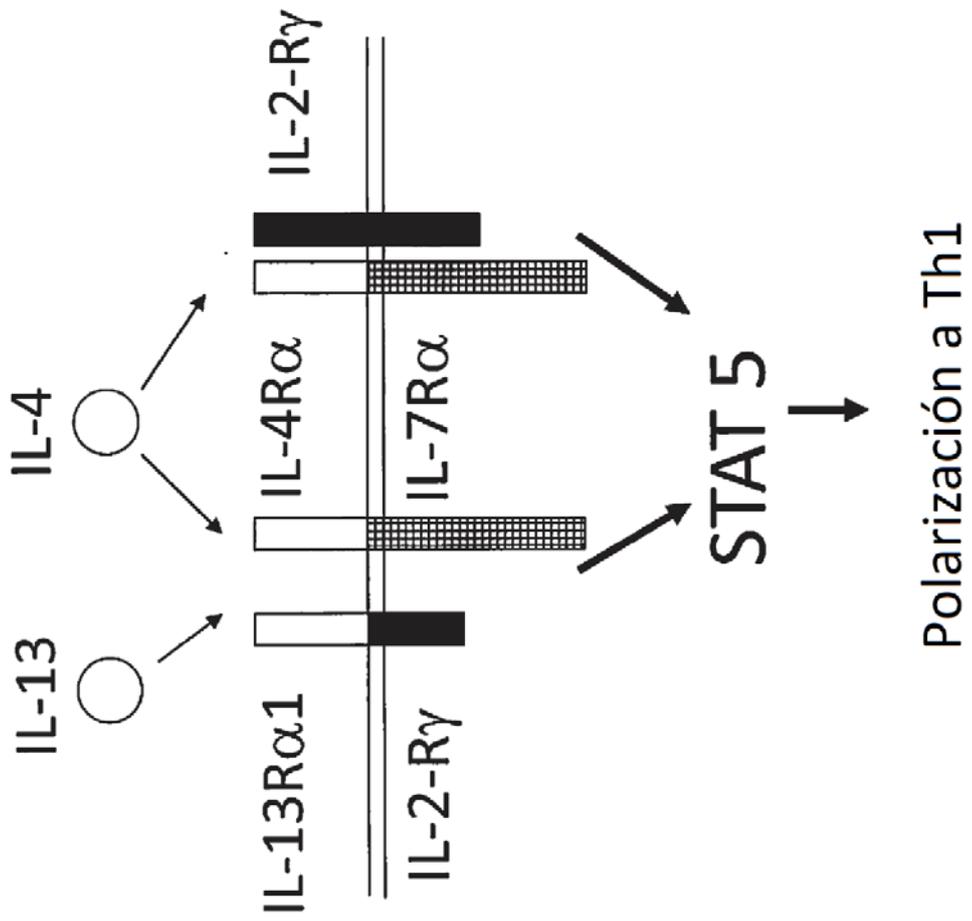


FIG. 3



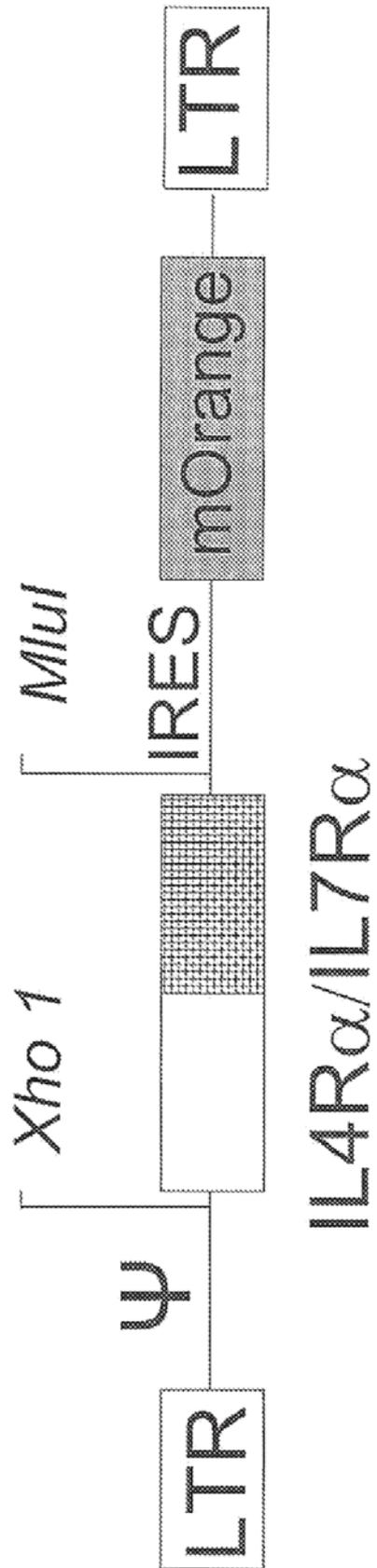


FIG. 4

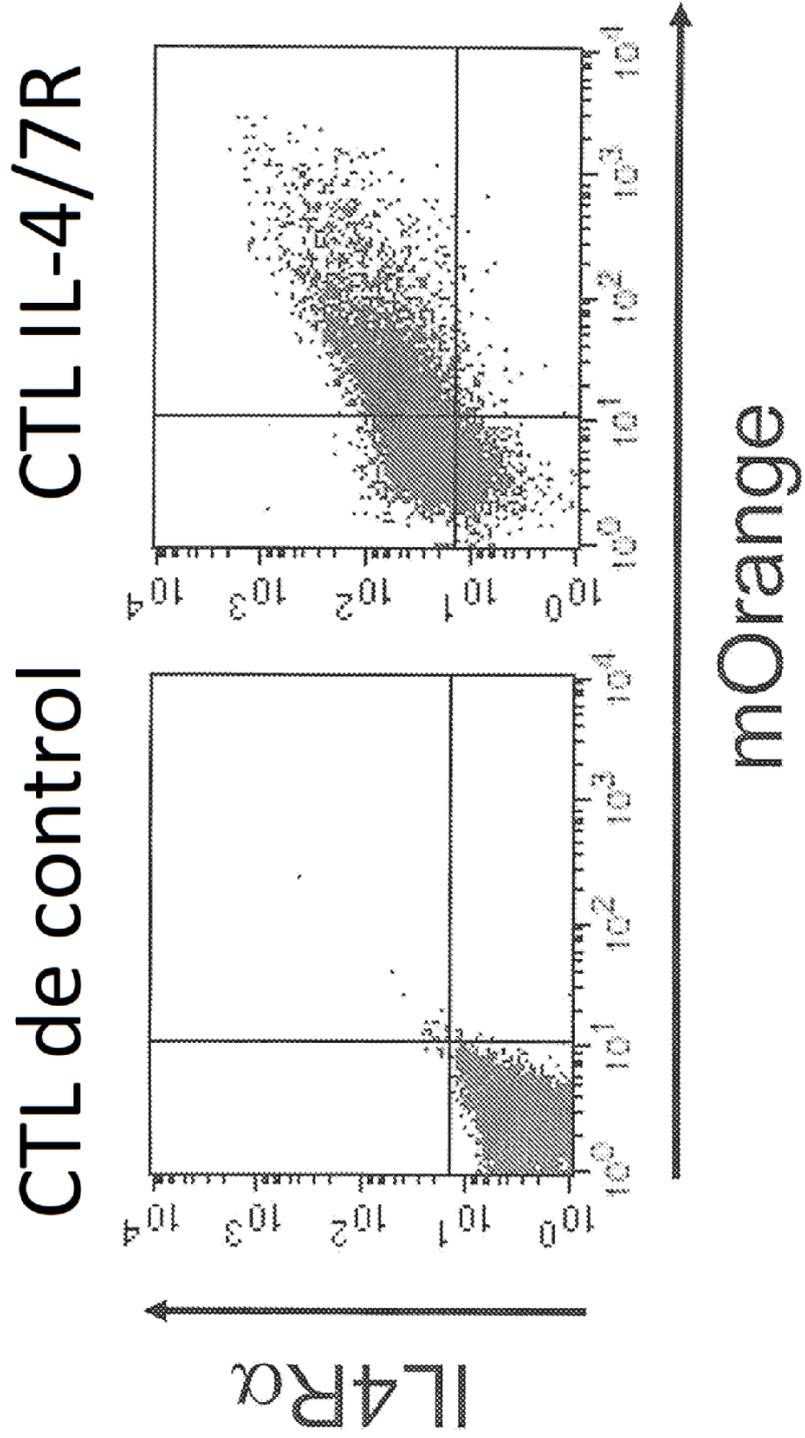


FIG. 5

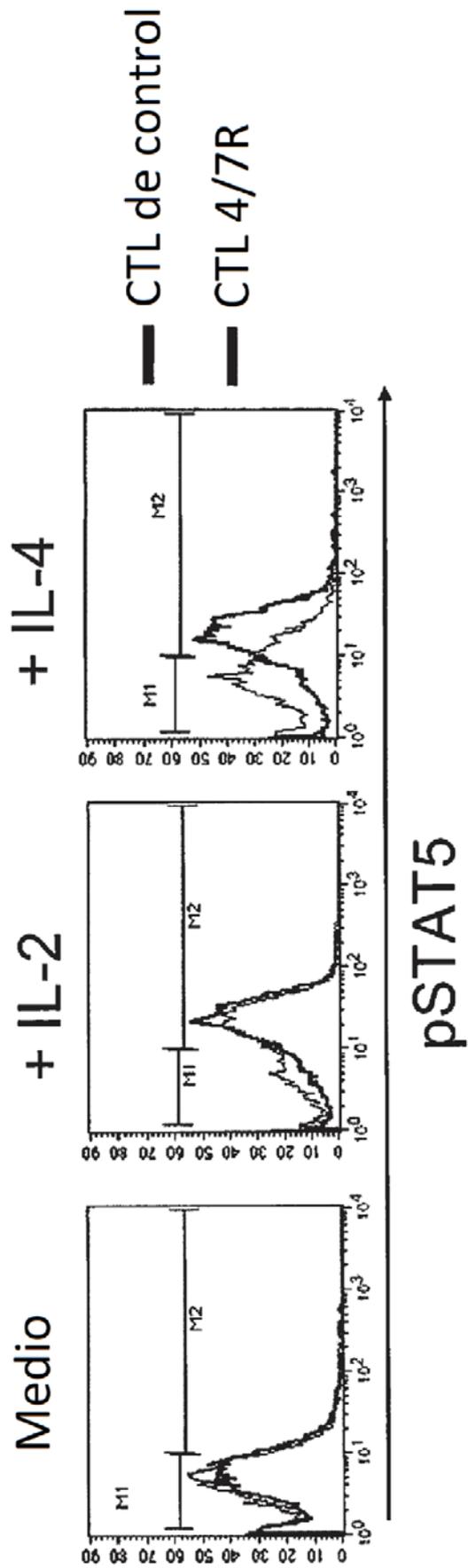


FIG. 6

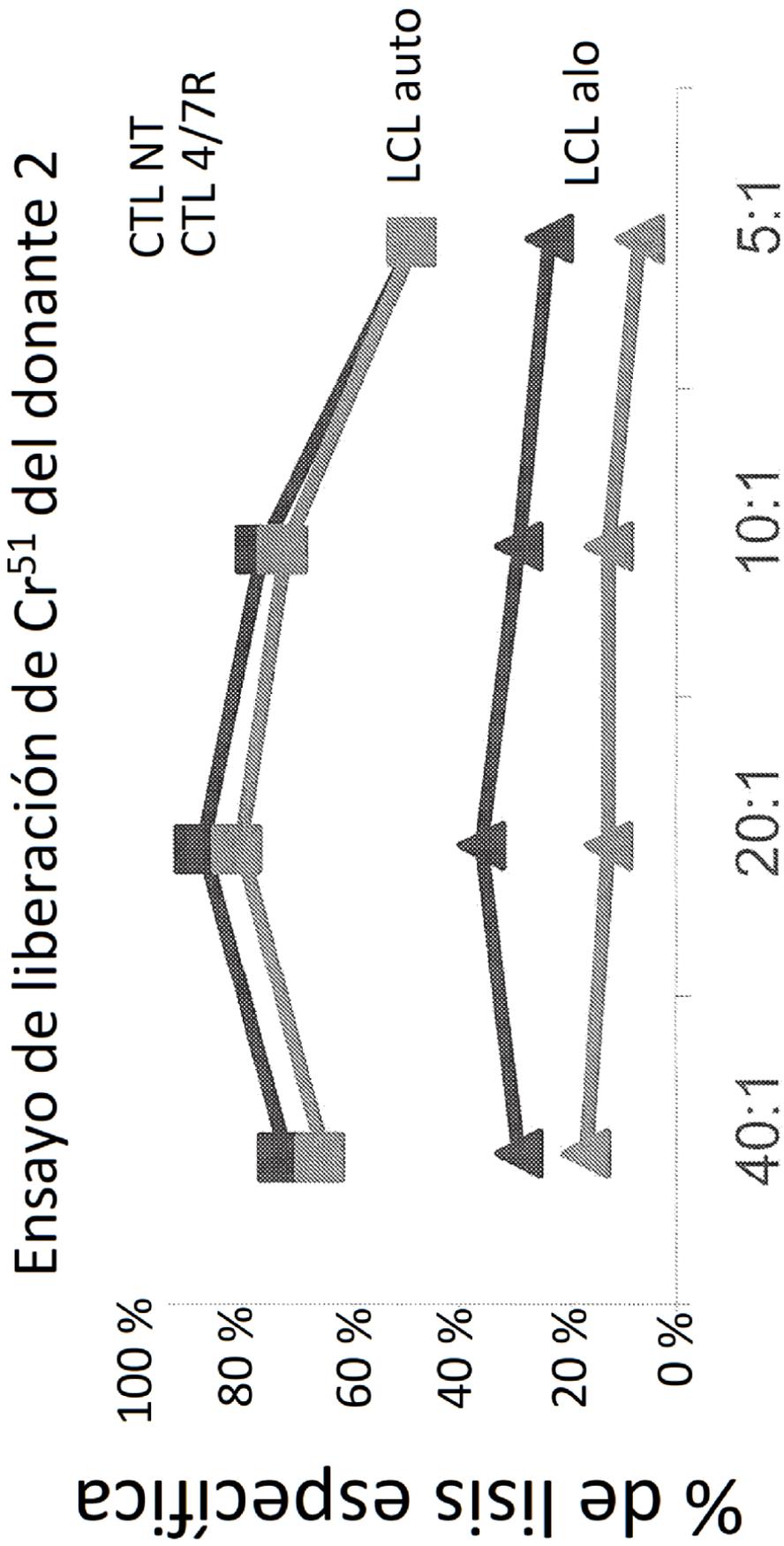
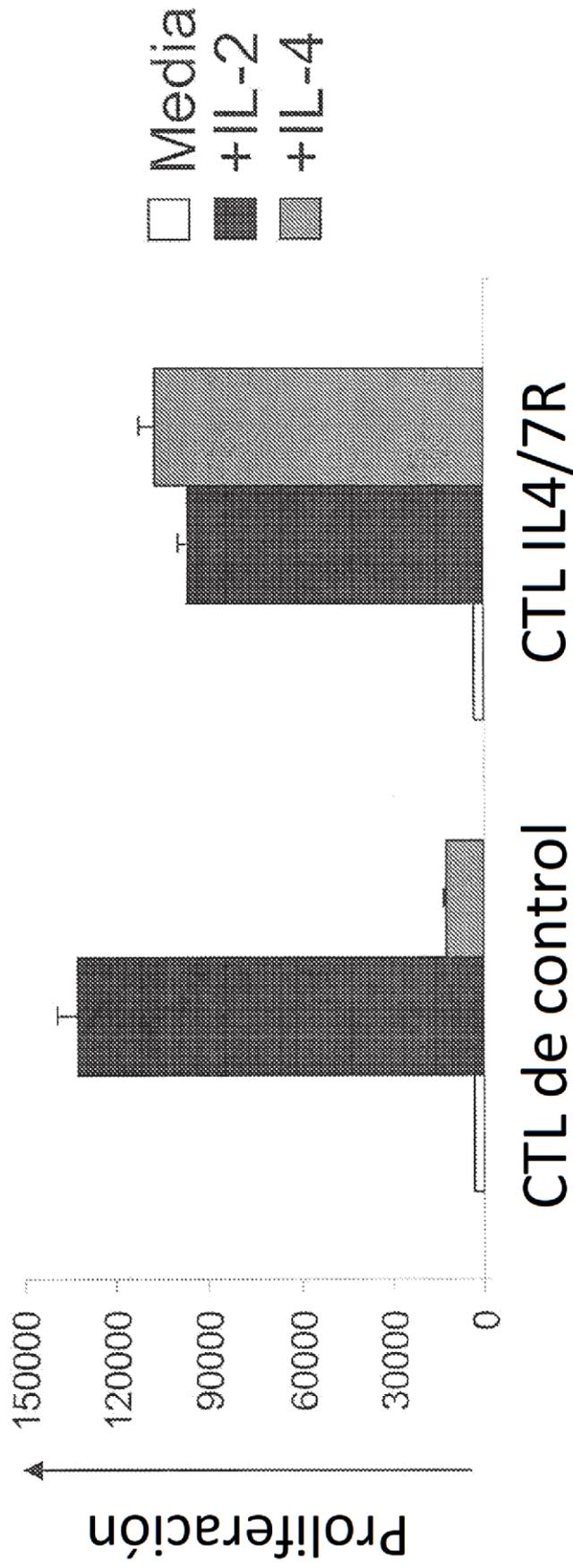
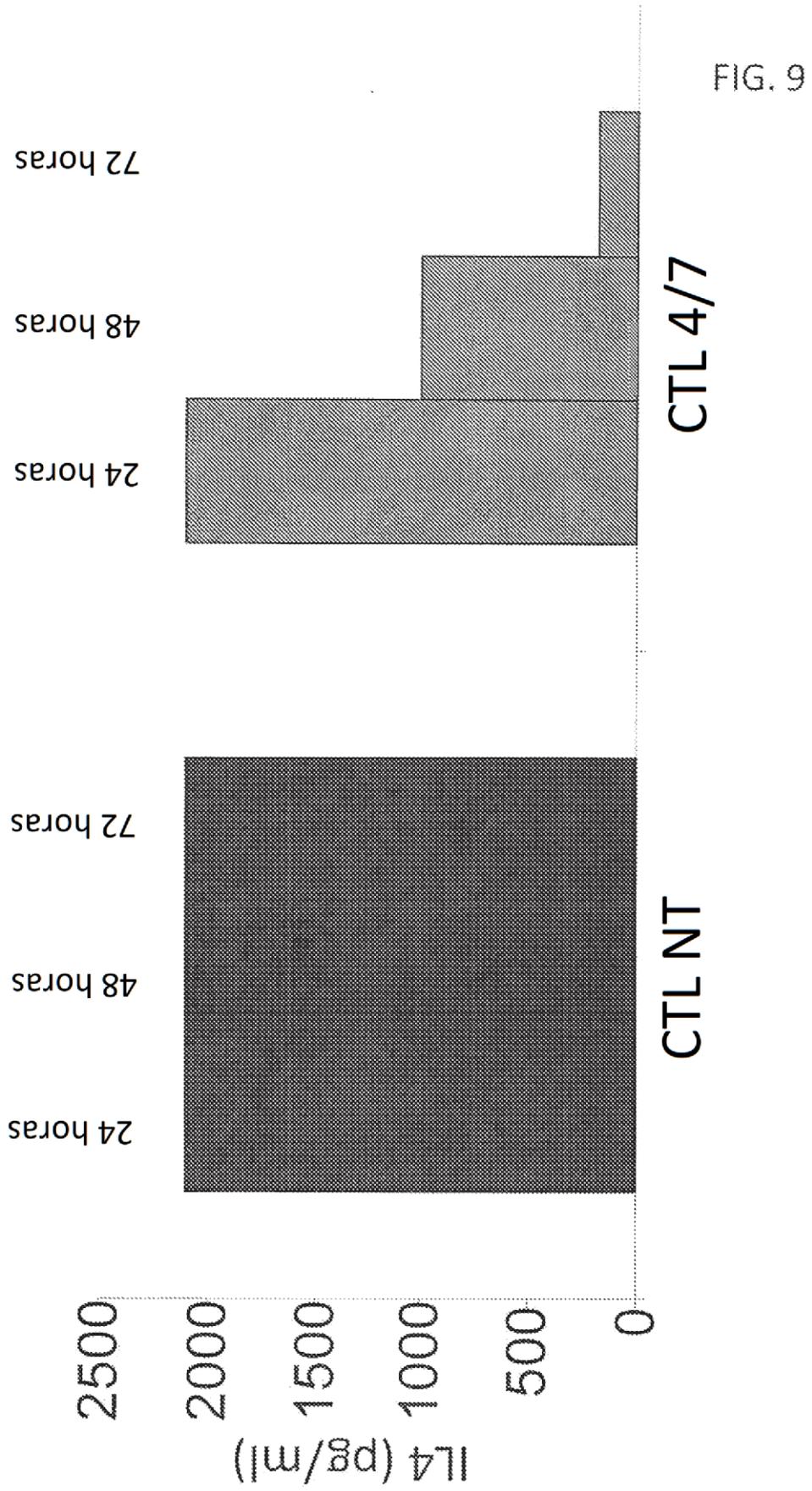


FIG. 7



Donante representativo (n=3)

FIG. 8



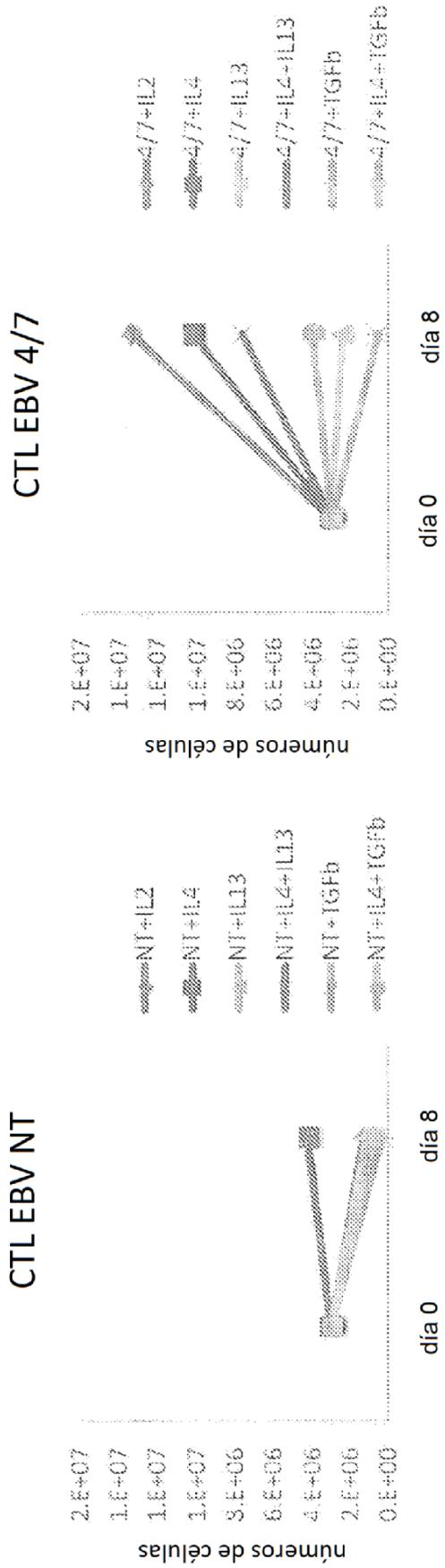


FIG. 10

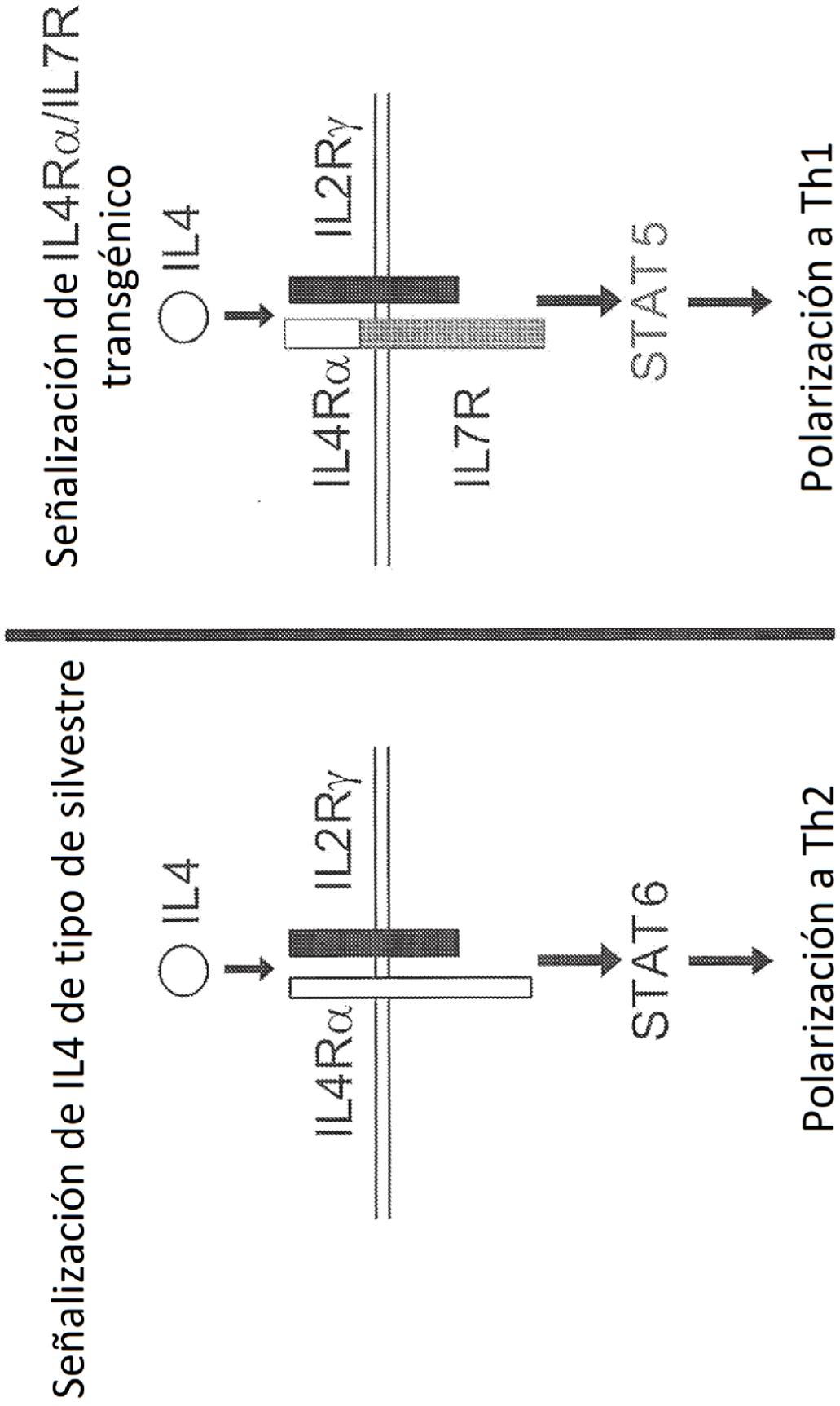
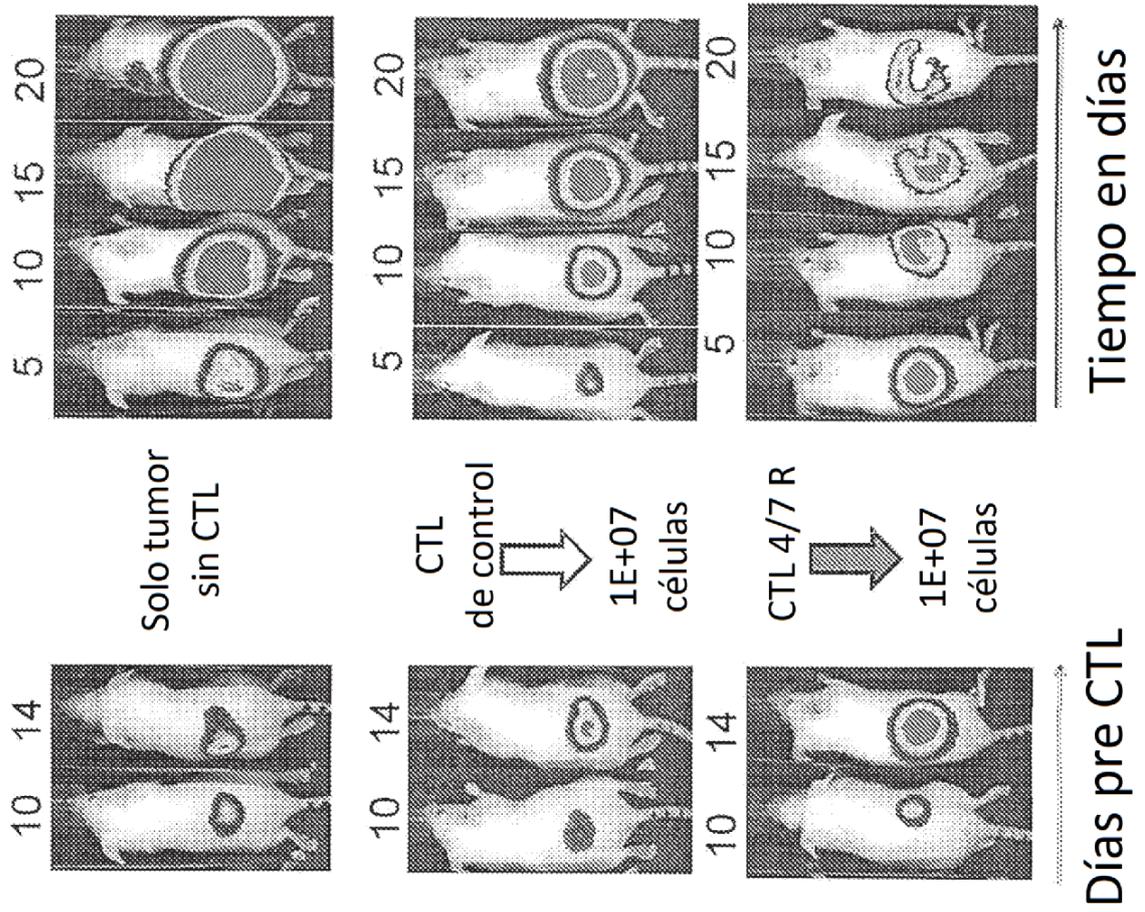


FIG. 11

FIG. 12



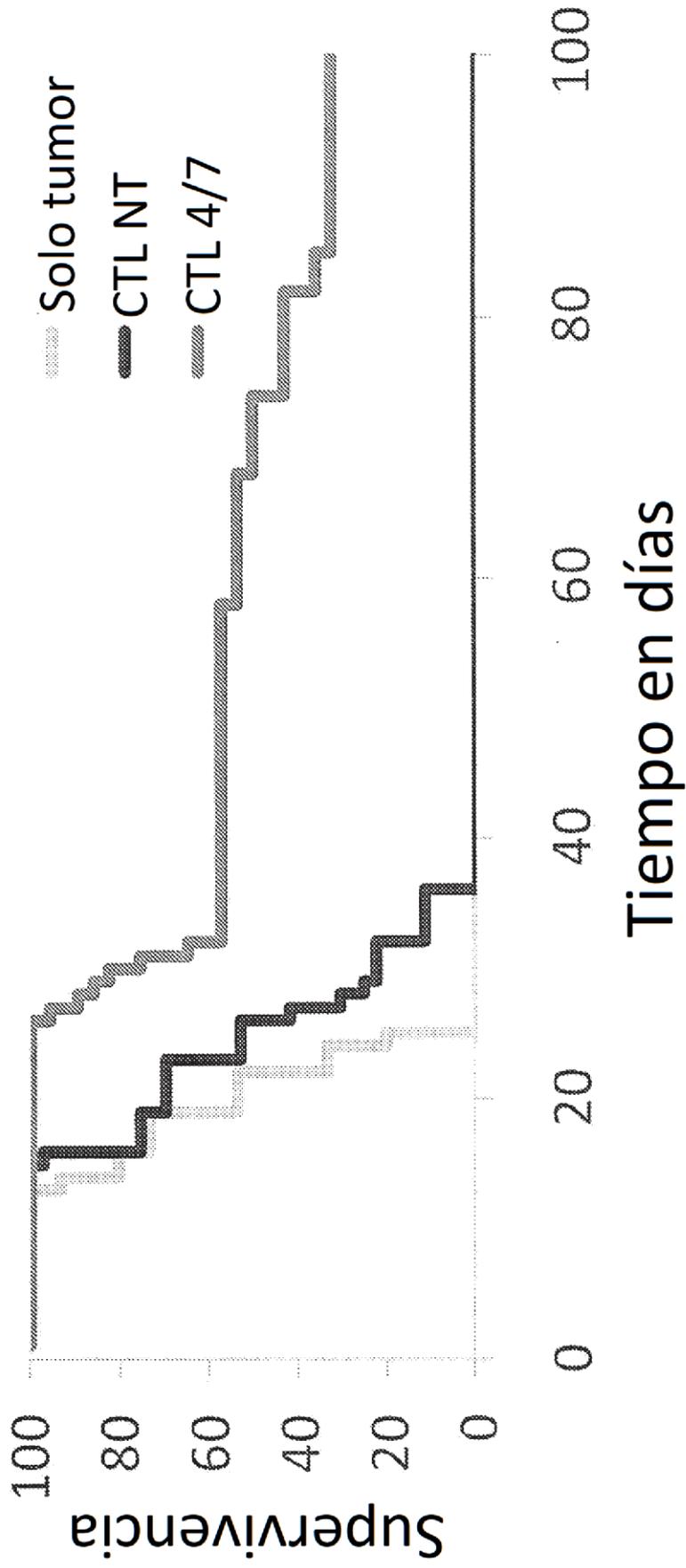


FIG. 14

Pac. panc. 1

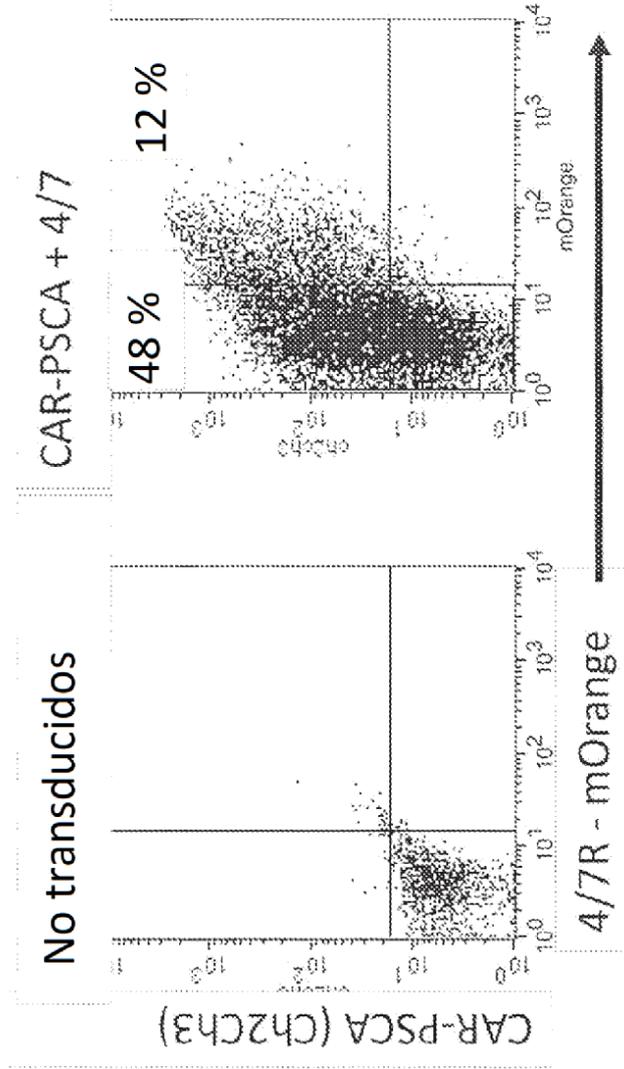
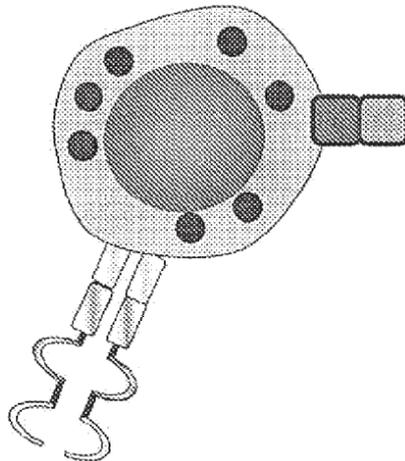


FIG. 15

CAR-PSCA



4/7R

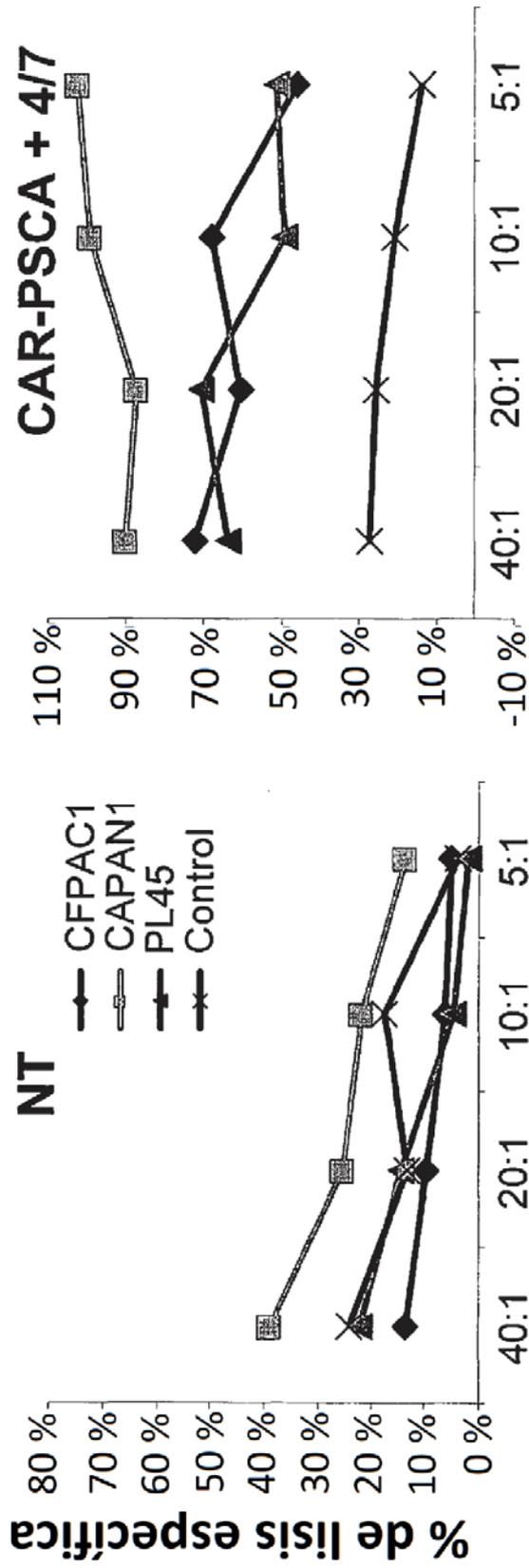


FIG. 16