

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 303**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|--------------------|-----------|-------------------|-----------|
| C12N 15/867 | (2006.01) | C12P 21/02 | (2006.01) |
| A61K 38/20 | (2006.01) | | |
| A61K 39/00 | (2006.01) | | |
| A61K 48/00 | (2006.01) | | |
| A61P 35/00 | (2006.01) | | |
| A61P 35/02 | (2006.01) | | |
| A61P 37/04 | (2006.01) | | |
| C07K 14/54 | (2006.01) | | |
| C12N 15/24 | (2006.01) | | |
| C12N 5/10 | (2006.01) | | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2008 PCT/CA2008/000849**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2008 WO08134879**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2008 E 08748251 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2150618**

54 Título: **Inmunoterapia de IL-12 contra el cáncer**

30 Prioridad:

04.05.2007 US 916136 P

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

13.02.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY HEALTH NETWORK (100.0%)
R. FRASER ELLIOTT BUILDING, ROOM 1S-417
190 ELIZABETH STREET
TORONTO, ON M5G 2C4, CA**

72 Inventor/es:

**MEDIN, JEFFREY, A. y
PAIGE, CHRISTOPHER, J.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 654 303 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

Inmunoterapia de IL-12 contra el cáncer5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general a composiciones para su uso en el tratamiento terapéutico y profiláctico del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a IL-12, a vectores lentivirales que codifican IL-12 para transducir células, y a las células transducidas para su uso en la inmunoterapia del cáncer.

10

Antecedentes de la invención

La inmunoterapia del cáncer tiene como objetivo superar la incapacidad del sistema inmunitario para proteger eficazmente contra el establecimiento de tumores o rechazar tumores establecidos.

15

Vectores lentivirales (LV)

Los vectores lentivirales (LV por sus siglas en inglés) son agentes de transferencia génica eficaces. Son estables y se pueden concentrar por ultracentrifugación a títulos elevados. En comparación con los adenovirus, por ejemplo, generan por sí mismos pocas consecuencias inmunológicas reduciendo las respuestas contra las células transducidas. Los avances en el diseño, la seguridad y los ensayos a largo plazo de LV aumentarán su adaptación clínica. Los LV se han utilizado en la terapia con inmunógenos contra el cáncer (Metharom, P. *et al.*, 2001; Firat, H. *et al.*, 2002), la inducción de las DC (Esslinger, C. *et al.*, 2003) y la presentación de antígenos para respuestas de los CTL (Breckpot, K. *et al.*, 2003; Esslinger, C. *et al.*, 2003), y la transducción de células CD34+ diferenciadas en DC hacia DC para la inmunoterapia del VIH/SIDA (Gruber, A. *et al.*, 2003).

20

25

Interleuquina-12

Las células cancerosas expresan antígenos. A pesar de la presencia de tales antígenos, los tumores no son generalmente fácilmente reconocidos y eliminados por el anfitrión, como lo demuestra el desarrollo de la enfermedad. La incapacidad del sistema inmunitario para proteger contra los tumores puede ser debida a los mecanismos de evasión, la supresión activa, o la activación sub-óptima de la respuesta.

30

Las citoquinas son integrantes de los sistemas inmunitarios tanto innato como adquirido. Pueden alterar el equilibrio de respuestas celulares y humores, alterar el cambio de clase de los linfocitos B y modificar las respuestas innatas.

35

La interleuquina-12 es una citoquina heterodimérica con múltiples efectos biológicos en el sistema inmunológico. Se compone de dos subunidades, p35 y p40, las cuales son necesarias para la secreción de la forma activa de la IL-12, p70. La interleuquina-12 actúa sobre las células dendríticas (DC), lo que lleva a un aumento de la maduración y la presentación de antígenos, que puede permitir el inicio de una respuesta de células T a los antígenos específicos del tumor. También impulsa la secreción de IL-12 por las DC, la creación de un mecanismo de retroalimentación positivo para amplificar la respuesta. Una vez que se inicia una respuesta, la IL-12 juega un papel fundamental en la dirección del sistema inmunológico hacia un perfil de citoquina Th1, la inducción de células T CD4⁺ para secretar el interferón-gamma (IFN- γ) y conducir a una respuesta de células T CD8⁺ citotóxicas⁴. Sin embargo, la IL-12 también es un fuerte citoquina pro-inflamatoria que conduce a la secreción de otras citoquinas, incluyendo factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que, combinado con IFN- γ , es un requisito previo para el desarrollo de linfocitos T CD4⁺ citotóxicos (CTL).⁵ Además, la IL-12 puede promover la activación de las células inmunitarias innatas tales como macrófagos y eosinófilos a través de su inducción de IFN- γ y otras citoquinas. Esta activación conduce a continuación a la secreción de IL-12 por estas células y a la amplificación adicional de las respuestas tanto innatas como adquiridas.⁴ Sin embargo, los altos niveles de IL-12, y en consecuencia de FN- γ , también se han asociado con la inducción de moléculas antagonistas tales como IL-10 y el agotamiento ("depletion") de moléculas de señalización aguas abajo de la IL-12, tales como STAT4.⁶⁻⁸

40

45

50

Se ha mostrado la inyección directa de IL-12 recombinante en algunos modelos de ratón de leucemia.⁹⁻¹³ Mientras que las pruebas iniciales en seres humanos que empleaban este enfoque fueron menos prometedoras (14-17 comentado en 4).

55

Las estrategias de terapia génica innovadoras pueden acelerar el desarrollo de la inmunoterapia profiláctica contra el cáncer.

60

Compendio

Los autores de la presente invención han demostrado que la administración intraperitoneal (IP) de dosis bajas de rIL-12 provoca una respuesta protectora contra una carga tumoral establecida y que esta respuesta dependiente de

células T CD8⁺ conduce a la memoria inmunitaria a largo plazo. Los autores de la presente invención también suministraron IL-12 por medio de las células tumorales transducidas, mediado por un sistema de suministro lentiviral para asegurar que las concentraciones óptimas de IL-12 estaban disponibles en el sitio del tumor. El método de suministro de IL-12 es muy eficaz y se aplica fácilmente a una variedad de cánceres.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona una construcción vector o virus aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1. En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula aislada y/o transducida para su uso de acuerdo con la reivindicación 7. En un aspecto adicional, la invención proporciona un método *ex vivo* de expresión de IL-12 en una célula de acuerdo con la reivindicación 10. En otro aspecto, la presente invención
10 proporciona un método de preparación de una composición para el suministro de IL-12 de acuerdo con la reivindicación 13.

La presente descripción proporciona en un aspecto, una composición que comprende:

15 un vector lentiviral;
un casete de expresión de IL-12.

En una realización, el casete de expresión de IL-12 comprende un polinucleótido que codifica opcionalmente un polipéptido p35 y un polinucleótido que codifica un polipéptido p40; o un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión de IL-12. En otra realización, el polipéptido de fusión de IL-12 tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el SEC ID NO: 4 y se une a un receptor de IL-12. En una realización adicional, el vector lentiviral comprende
20 opcionalmente uno o más de: una repetición larga terminal 5' (LTR), una secuencia señal del VIH, un sitio de empalme 5' de la señal Psi del VIH (SD), un elemento delta-GAG, un Elemento de Respuesta a Rev (RRE), un sitio de empalme 3' (SA), un promotor del factor de Elongación alfa-1 (EF) y una LTR de auto-Inactivación 3 (SIN-LTR). En aún una realización adicional, el vector lentiviral comprende un tracto central de polipurina opcionalmente de
25 SEQ ID NO: 2 y/o un elemento regulador post-transcripcional del virus hepatitis de la marmota, opcionalmente de SEQ ID NO: 3; o una secuencia que tiene al menos 70% de identidad de secuencia con el SEC ID NO: 2 y/o el SEQ ID NO: 3. En otra realización, el vector lentiviral comprende una cadena principal pHR'. En una realización, el vector lentiviral es un vector de calidad clínica. En una realización, la composición comprende adicionalmente un polinucleótido activador que codifica un polipéptido que convierte un profármaco en un fármaco, opcionalmente un polinucleótido tmpk modificado. En una realización adicional más, el polinucleótido activador comprende un polinucleótido tmpk con al menos 80% de identidad de secuencia con un polinucleótido tmpk modificado descrito en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, la composición comprende adicionalmente un casete de detección. En una realización, el casete de detección comprende un CD19, CD19 truncado, CD20, CD24 humano, HSA murino, CD25 humano (huCD25), una forma truncada de baja afinidad del receptor del factor de crecimiento nervioso (LNGFR), CD34 truncado, eGFP, eYFP, o cualquier otra proteína fluorescente o polinucleótido del receptor de eritropoyetina (EpoR); o un polinucleótido con al menos 70% de identidad de secuencia con dicho polinucleótido.

40 En otra realización, la composición comprende adicionalmente un casete de inmunomodulador. En una realización, el casete de inmunomodulador comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que modula una célula inmunitaria, opcionalmente una célula dendrítica o una célula T, opcionalmente una célula T CD4+, opcionalmente CD40L, IL-7, o IL-15. En otra realización la composición es una composición farmacéutica y comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto, la descripción proporciona una construcción vector que comprende:
un vector lentiviral;
un casete de expresión de IL-12.

50 En otro aspecto, la descripción proporciona un virus aislado que comprende la construcción de vector o la composición descrita en la presente memoria.

Un aspecto adicional de la descripción proporciona una célula aislada que secreta IL-12 a un nivel umbral o por encima del mismo, en donde la célula está opcionalmente transducida con la composición, la construcción vector o el virus aislado descrito en la presente memoria. En una realización, la célula es una célula cancerosa, opcionalmente una línea celular establecida, opcionalmente una célula cancerosa primaria, opcionalmente una célula cancerosa obtenida de un sujeto. En otra realización, la célula cancerosa es una célula leucémica, opcionalmente una célula de LLA, una célula de LMA, una célula de LMC o una célula de LLC. En una realización adicional, el nivel umbral es al menos 1500 pg/ml/10⁶células/2 horas de IL-12, opcionalmente al menos 1500
60 pg/ml/10⁶células/2 horas, 1500-2500 pg/ml/10⁶células/2 horas, 2500-5000 pg/ml/10⁶células/2 horas, 5000 a 7500 pg/ml/10⁶células/2 horas, 7.500 a 10.000 pg/ml/10⁶células/2 horas, 10.000-12.500 pg/ml/10⁶células/2 horas, 12.500 a 15.000 pg/ml/10⁶células/2 horas, 15000-17500 pg/ml/10⁶células/2 horas, 17500-20000 pg/ml/10⁶células/2 horas o al menos 20.000 pg/ml/10⁶células/2 horas de IL-12

Otro aspecto de la descripción proporciona una población de células que comprende células aisladas y/o células

transducidas descritas en la presente memoria en donde la población de células comprende opcionalmente al menos 0,1 a 1% de células productoras de IL-12, células opcionalmente leucémicas, opcionalmente aproximadamente 0,5%, aproximadamente 1%, aproximadamente 1-5%, 5-10%, 10-20% o más células productoras de IL-12, opcionalmente células leucémicas, y en donde la población de células secreta por encima del nivel umbral, opcionalmente el nivel umbral necesario para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria dependiente de células T CD4+, opcionalmente al menos 1.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 1.500-2.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 2.500-5.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 5.000 a 7.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 7.500 a 10.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 10.000-12.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 12.500-15.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 15.000-17.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 17.500-20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas o al menos 20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12. En una realización, la población de células deriva de un clon que secreta IL-12 por encima del nivel umbral, opcionalmente al menos 1.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12.

Un aspecto adicional de la descripción proporciona una composición que comprende el virus aislado, la célula o la población de células descritos en la presente memoria.

Otro aspecto de la descripción proporciona un método de expresión de IL-12 en una célula, opcionalmente una célula cancerosa que comprende poner en contacto la célula con la composición, la construcción vector o el virus aislado en condiciones que permiten la transducción de la célula, proporcionando de este modo una célula transducida, opcionalmente en donde la IL-12 es secretada. En una realización, el método comprende adicionalmente una etapa de aislamiento de la célula transducida o aislamiento de una población de células que comprende la célula transducida. En otra realización, el método comprende adicionalmente:

la detención del crecimiento de la célula transducida, la población de células o la composición; y
la introducción de la célula transducida, la población de células y/o la composición en un sujeto.

Otro aspecto de la descripción proporciona un método para reducir el número de células tumorales o la carga de cáncer en un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto un virus aislado, una célula transducida, una población de células o una composición descritos en la presente memoria. Otro aspecto proporciona un método de tratamiento de un sujeto con cáncer o con un mayor riesgo de cáncer, que comprende administrar al sujeto un virus aislado, una célula transducida, una población de células o una composición descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente el control de la progresión del cáncer.

En ciertas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido. En otras realizaciones, el cáncer es leucemia, opcionalmente LLA, LMA, LMC o LLC.

Un aspecto adicional de la descripción proporciona un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto opcionalmente con cáncer o con un mayor riesgo de cáncer, que comprende administrar al sujeto un virus aislado, una célula transducida, una población de células o una composición descritos en la presente memoria.

En un aspecto, la descripción proporciona un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria de memoria en un sujeto, opcionalmente con cáncer o con un mayor riesgo de cáncer, que comprende administrar al sujeto un virus aislado, una célula transducida, una población de células o una composición descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria mediada por células T CD4+. En ciertas realizaciones, se detiene el crecimiento de la célula transducida antes de la administración al sujeto. En una realización, la célula transducida se irradia antes de la administración al sujeto.

También se proporciona un método de administración de IL-12 a un sujeto, opcionalmente con cáncer o con un mayor riesgo de cáncer, opcionalmente, para mejorar el tratamiento del cáncer que comprende:

la generación de una célula secretora de IL-12 en donde la IL-12 secretada por célula está por encima de un nivel umbral; y
la introducción de un número eficaz de células secretoras de IL-12 generadas al sujeto.

Otro aspecto de la descripción proporciona un método para mantener los niveles de IFNgamma inducidos por IL-12 en un anfitrión que comprende:

la generación de una célula secretora de IL-12 en donde la IL-12 secretada por la célula está por encima de un nivel umbral; y
la introducción de un número eficaz de las células secretoras de IL-12 generadas en el paciente.

En ciertas realizaciones, el nivel umbral de la IL-12 secretada es de al menos 1,5 fg/ml/célula/2 horas. En otras realizaciones, el nivel umbral de la IL-12 secretada es de al menos 1,5 pg/ml/célula/2 horas. En ciertas realizaciones, la célula secretora de IL-12 es generada poniendo en contacto la célula con una composición que comprende un vector de suministro lentiviral y un casete de expresión de IL-12.

En ciertas realizaciones, la célula es opcionalmente una célula cancerosa, opcionalmente derivada del sujeto con cáncer. En ciertas realizaciones, las células se introducen mediante inyección IP, por vía subcutánea o intradérmica.

5 En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria se inicia contra una leucemia. En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria se inicia sustancialmente libre de inducción o potenciación de una respuesta inmunitaria dependiente de células T CD8⁺. En otras ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria conduce a la memoria inmunitaria a largo plazo. En ciertas realizaciones, la respuesta inmunitaria no induce ni potencia citoquinas antagonistas.

En ciertas realizaciones, el nivel de IL-12 producido está por encima de un nivel umbral que mejora la maduración de células dendríticas y/o la presentación de antígenos.

10 En otro aspecto, la solicitud proporciona el uso de un virus aislado, una célula transducida, una población de células o una composición descritos en la presente memoria para reducir el número de células tumorales o la carga de cáncer en un sujeto que lo necesite.

15 En otro aspecto, la descripción proporciona el uso de un virus aislado, una célula transducida, una población de células o una composición descritos en la presente memoria para el tratamiento de un sujeto con cáncer.

20 En otro aspecto, la descripción proporciona el uso de un virus aislado, una célula transducida, una población de células o una composición descritos en la presente memoria para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

En otra realización, la descripción proporciona el uso de un virus aislado, célula transducida, la población de células o composición descritos en la presente memoria para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria de memoria en un sujeto.

25 En otro aspecto, la solicitud proporciona el uso de una célula secretora de IL-12 para el suministro de IL-12 a un sujeto, opcionalmente con cáncer o con un mayor riesgo de cáncer opcionalmente para mejorar el tratamiento del cáncer:

30 generando una célula secretora de IL-12 en donde la IL-12 secretada por célula está por encima de un nivel umbral; y
aislando un número eficaz de las células secretoras de IL-12 generadas para su introducción en el sujeto.

35 En otro aspecto, la descripción proporciona el uso de un virus aislado, una célula transducida, una población de células o una composición descritos en la presente memoria, para tratar a un sujeto que lo necesite, opcionalmente un sujeto con cáncer o con un mayor riesgo de desarrollar cáncer.

40 En ciertas realizaciones, el número de células administradas oscila de 10⁵ células a 10⁹ células, opcionalmente aproximadamente 10⁵, aproximadamente 10⁶ células, aproximadamente 10⁷ células, aproximadamente 10⁸ células, o aproximadamente 10⁹ células. En otras realizaciones, la población de células administrada oscila de 10⁵ células a 10⁹ células, opcionalmente aproximadamente 10⁵ células, aproximadamente 10⁶ células, aproximadamente 10⁷ células, aproximadamente 10⁸ células, o aproximadamente 10⁹ células.

Se debe entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos se proporcionan a modo de ilustración solamente.

45 Breve descripción de las figuras

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención:

50 **FIGURA 1a Protección mediada por rIL-12 administrada IP de ratones** 6 sensibilizados con células 70Z/3-L. Los ratones fueron sensibilizados con 10 células IP y no recibieron ningún tratamiento, o recibieron inyecciones de 0,1, 1, 10 o 20 ng/ratón/día de rIL-12 durante 14 días ($n = 5$ ratones por cada grupo).

55 **FIGURA 1b La terapia con rIL-12 administrada IP conduce a la protección a largo plazo contra la sensibilización con 70Z/3-L.** (i) ratones que no han recibido tratamiento previo (A, $n = 10$) fueron sensibilizados con células 70Z/3-L el día 0 y se trataron durante 14 días con inyecciones de 20 ng de rIL-12/ratón/día. Un grupo de ratones (B₁, $n = 7$) fue incluido como control para las células 70Z/3-L (comparación de curvas por medio del Prueba de Rango Logarítmico, $p = 0,001$). (ii) Después de un período de 70 días, cinco ratones del grupo A, después de haber sido sometidos a terapia de rIL-12, fueron sensibilizados secundariamente con 10⁶ células 70Z/3-L sin tratamiento adicional de rIL-12. Los otros cinco animales se mantuvieron para confirmar que no aparecía toxicidad después de 70 días. Se incluyeron cinco ratones no sometidos a tratamiento previo (B₂) para demostrar la letalidad de las células 70Z/3-L (la comparación de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se ha realizado mediante el Prueba de Rango Logarítmico $p = 0,0015$).

60 **FIGURA 1c La administración IP retardada de la terapia con rIL-12 conduce a la protección.** Se inyectaron a los ratones 10⁴ células 70Z/3-L el día 0. Un grupo de control (70Z/3-L) no recibió tratamiento ($n = 4$). Desde los días 0 a 5, grupos de 4 o 5 ratones (5 ratones para los días 0, 1 y 2, 4 ratones para los días 3, 4

y 5) comenzaron a recibir inyecciones de 20 ng de rIL-12/ratón/día durante 14 días. Los animales fueron controlados y sacrificados por la aparición de síntomas. La comparación de curvas se realizó mediante el Prueba de Rango Logarítmico. Todos los grupos de tratamiento son significativamente diferentes del grupo control ($p = 0,0029$) pero no son significativamente diferentes entre sí.

FIGURA 1d Requerimiento de células T e IFN- γ para la protección mediada por rIL-12 después de la administración IP. Los ratones ($n = 5$ ratones en cada grupo) experimentaron agotamiento utilizando anticuerpos como se describe en Materiales y Métodos. Los ratones fueron sensibilizados con 10^6 células 70Z/3-L IP, inyectando 20 ng/ratón/día de rIL-12 y se controlaron para determinar la aparición de los síntomas. La comparación de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se realizó mediante el Prueba de Rango Logarítmico ($p < 0,0018$).

FIGURA 2a Representación esquemática del vector LV-mulL-12 (LV-cPPT-EF1-mIL-12-WPRE). LTR: repetición terminal larga; SD: donador de empalme; RRE; elemento de respuesta *rev*; SA: acceptor de empalme; cPPT: tracto de polipurina central; CMV: citomegalovirus; WPRE: elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota; mullL-12: interleuquina-12 murina; SIN: LTR de auto-activación.

FIGURA 2b La secreción de interleuquina-12 por clones transducidas por el vector es un rasgo estable. Los niveles de secreción de IL-12 se midieron por medio de ELISA en 2-5 ocasiones independientes y se observó que permanecía bastante constante; las diferencias no son estadísticamente significativas.

FIGURA 3 La terapia con IL-12 mediada por células de leucemia conduce a la protección de los ratones sensibilizados. Se inyectó IP a los ratones PBS o 10^6 células de cualquiera de la línea parental, 70Z/3-L, o uno de los clones transducidos por el vector y se controló la aparición de los síntomas. Clones secretaban diferentes niveles de IL-12 y se estableció un umbral teórico, por debajo del cual no se confería protección.

FIGURA 4 La terapia con IL-12 mediada por células de leucemia conduce a la protección de los ratones sensibilizados cuando sólo una parte de las células son transducidas con vector. Se inyectaron IP a los ratones 10^6 células de la línea parental, 70Z/3-L, y proporciones variables a.) 2%, 10% y 50% del clon secretor de LV12.1 o b.) 0,1%, 0,5%, 1% y 10% de LV12.2 y LV12.3, y se controló la aparición de los síntomas.

FIGURA 5 La terapia con IL-12 mediada por células de leucemia conduce a la protección específica y a largo plazo contra la sensibilización con 70Z/3-L. Los ratones fueron sensibilizados inicialmente con 10^6 células LV12.2 o se les inyectó PBS. Más de 110 días después de la sensibilización primaria, los ratones cebados ($n = 4$ en cada grupo) fueron sensibilizados secundariamente, ya sea con 10^6 células 70Z/3-L o 10^6 células L1210. Los ratones a los que se había inyectado PBS ($n = 5$ en cada grupo) también recibieron 10^6 células 70Z/3-L o 10^6 células L1210 para controlar su eficacia para dirigir a la morbilidad, o otra inyección de PBS y se controlaron para determinar la aparición de los síntomas. La curva de comparación de supervivencia de Kaplan-Meier se realizó mediante la prueba de Rango logarítmico, $p < 0,0001$.

FIGURA 6 Requerimiento del subconjunto de células T CD4⁺ para la protección mediada por células de leucemia de ratones sensibilizados. Los ratones ($n = 5$ en cada grupo) experimentaron agotamiento utilizando anticuerpos como se describe en Materiales y Métodos. Los ratones fueron sensibilizados con 10^6 células LV12.2 IP y controlados para detectar la aparición de los síntomas. La comparación de curvas de Kaplan-Meier se realizó mediante la Prueba de Rango Logarítmico, $p = 0,0084$.

FIGURA 7 Perfiles de expresión de citoquina de ratones que recibieron la administración IP y terapias con IL-12 mediadas por células de leucemia. Los ratones ($n = 4$ en cada grupo) que recibieron la terapia con rIL-12 administrada IP fueron sensibilizados con 10^6 células 70Z/3-L y no recibieron ningún tratamiento o recibieron inyecciones de 10 o 20 ng/ratón/día de rIL-12 durante 14 días. Los ratones ($n = 4$ en cada grupo) que recibieron terapia con IL-12 mediada por células de la leucemia fueron sensibilizados con 10^6 células 70Z/3-L IP y no recibieron ningún tratamiento o recibieron tratamiento con diversas proporciones (0,5%, 1% o 10%) del clon transducido con el vector LV12.2. Las muestras de suero se recogieron y se analizaron en los días 7, 10 y 20 como se describe en Materiales y Métodos. (* - todos los ratones del grupo 2 en el modelo mediado por células de leucemia estaban muertos el día 20 de manera que el suero de este grupo no se recogió).

Descripción detallada

Los autores de la presente invención han demostrado que la administración de dosis bajas de IL-12 recombinante (rIL-12) provoca una respuesta protectora contra una carga de leucemia establecida y que el rechazo está mediado por una respuesta inmunitaria dependiente de células T CD4⁺ y CD8⁺ que conduce a la memoria inmunitaria a largo plazo sin la inducción de citoquinas antagónicas. Los autores de la presente invención han comparado este protocolo con un enfoque de terapia celular en el que se transdujeron células leucémicas con una expresión modificada genéticamente con un vector de lentivirus (LV) de ADNc de IL-12 murina (ambas subunidades). Se establecieron clones de las células leucémicas que producían una amplia gama de IL-12. La inyección de células leucémicas productoras de IL-12 provocó una inmunidad específica y a largo plazo sin la inducción de mecanismos antagónicos. La eliminación de la leucemia en este caso, sin embargo, estuvo mediada por un subgrupo celular CD4⁺ solo, lo que sugiere una ruta cualitativamente diferente para la inmunidad que se observaba en la terapia sistémica. Los autores de la presente invención encontraron que la inyección de tan poco como 1% de células leucémicas productoras de IL-12, junto con 99% de células leucémicas no transducidas, era suficiente para provocar

una inmunidad protectora, siempre que cada una de estas células produjera IL-12 por encima de un umbral necesario. Este hallazgo podría explicar el fracaso de muchos protocolos basados en terapia celular humana, porque en estos casos la producción de IL-12 se mide en las poblaciones masivas por lo que es imposible saber si se está produciendo suficiente IL-12 en el medio ambiente local influenciado por la célula productora de IL-12. La producción media referida en estos estudios está muy por debajo del umbral referido en la presente descripción.

Las construcciones de vectores, las composiciones, las células y los métodos descritos en la presente memoria para el suministro de IL-12 son muy eficaces y se aplican fácilmente a una variedad de cánceres.

10 Definiciones

El término "una célula" según se utiliza en la presente memoria incluye una pluralidad de células.

15 El término "LLA" según se utiliza en la presente memoria se refiere a la leucemia linfoblástica aguda, que es una leucemia de rápido crecimiento en la que las células hematopoyéticas malignas son células precursoras linfoides. Las anomalías citogenéticas se producen en ~70% de los casos de LLA en adultos, pero no están asociadas con un solo evento translocación.

20 El término "alogénico" también referido como "alogeneico" según se utiliza en la presente memoria significa que las células, tejidos, ADN, o factores tomados o derivados de un sujeto diferente de la misma especie. Por ejemplo en el contexto en el que las células cancerosas alogénicas transducidas se administran a un sujeto con cáncer, las células cancerosas retiradas de un paciente que no es el sujeto, se transducen o transfectan con un vector que dirige la expresión de IL-12 y las células transducidas se administrada al sujeto. La frase "dirige la expresión" se refiere al polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la molécula que se va a expresar. El polinucleótido puede comprender una secuencia adicional que aumenta la expresión de la molécula en cuestión.

30 El término "LMA" según se utiliza en la presente memoria se refiere a la leucemia mieloide aguda, una enfermedad que progresa rápidamente en la que están presentes demasiados glóbulos no linfocíticos inmaduros en la sangre y la médula ósea. También se llama leucemia mielógena aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia no linfocítica aguda, y LNLA.

35 El término "anticuerpo" según se utiliza en la presente memoria pretende incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y anticuerpos quiméricos. El anticuerpo puede ser de fuentes recombinantes y/o producidos en animales transgénicos. Se pretende que el término "fragmento de anticuerpo" según se utiliza en la presente memoria incluya sin limitaciones Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, y multímeros de los mismos, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos y Anticuerpos de un solo Dominio. Los anticuerpos se pueden fragmentar utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos F(ab')₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab. También se pueden sintetizar Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos mediante técnicas recombinantes. El término también incluye anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a los polipéptidos de un casete de detección descritos en la presente memoria.

45 Por " condiciones de hibridación al menos moderadamente rigurosas" se quiere significar que se seleccionan las condiciones que promueven la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico complementarias en solución. La hibridación se puede producirse a toda o una porción de una molécula de la secuencia de ácido nucleico. La porción de hibridación tiene típicamente al menos 15 (p.ej. 20, 25, 30, 40 o 50) nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica reconocerán que la estabilidad de un ácido nucleico dúplex, o de los híbridos, se determina por la T_m, que en los tampones que contienen sodio es una función de la concentración de iones de sodio y la temperatura ($T_m = 81,5^{\circ}\text{C} - 16,6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41 (\%(\text{G}+\text{C}) - 600/\text{l})$, o una ecuación similar). Por consiguiente, los parámetros en las condiciones de lavado que determinan la estabilidad del híbrido son la concentración de ión sodio y la temperatura. Con el fin de identificar moléculas que son similares, pero no idénticas, a una molécula de ácido nucleico conocida se puede suponer que un desajuste de 1% da como resultado una disminución de 1°C en la T_m, por ejemplo si se buscan moléculas de ácido nucleico que tengan una identidad > 95%, la temperatura de lavado final se reducirá en aproximadamente 5°C. Basándose en estas consideraciones los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar fácilmente las condiciones de hibridación apropiadas. En realizaciones preferidas, se seleccionan condiciones de hibridación rigurosas. A modo de ejemplo, se pueden emplear las siguientes condiciones para lograr la hibridación rigurosa: hibridación a 5x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC)/5x solución de Denhardt/SDS al 1,0% a T_m - 5°C basándose en la ecuación anterior, seguido de un lavado de 0,2x SSC/SDS al 0,1% a 60°C. Las condiciones de hibridación moderadamente rigurosas incluyen una etapa de lavado en 3x SSC a 42°C. Se entiende, sin embargo, que se pueden lograr rigurosidades equivalentes utilizando tampones, sales y temperaturas alternativos. Se puede encontrar una orientación adicional con respecto a las condiciones de hibridación en: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002, y en: .

Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

5 El término "autólogo" según se utiliza en la presente memoria se refiere a células, tejidos, ADN o factores tomados o derivados de los propios tejidos, células o ADN de un individuo. Por ejemplo en el contexto en el que las células cancerosas autólogas transducidas se administran a un sujeto con cáncer, las células cancerosas retiradas del sujeto son transducidas o transfectadas con un vector que dirige la expresión de IL-12 y las células transducidas se administran al sujeto.

10 La expresión "carga cancerosa" se refiere a la cuantía de las células cancerosas o al volumen del cáncer en un sujeto. La reducción de la carga cancerosa en consecuencia se refiere a la reducción del número de células cancerosas o el volumen del cáncer en un sujeto.

15 La expresión "cáncer que se caracteriza por períodos de remisión" se refiere a los cánceres que pueden responder a un tratamiento, pero en donde el cáncer reaparece en algún momento posterior lo que sugiere que no todas las células cancerosas fueron erradicadas por el tratamiento. Un ejemplo de tal cáncer es la LLC.

El término "célula cancerosa" según se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier célula que es una célula cancerosa o deriva de una célula cancerosa, por ejemplo, un clon de una célula cancerosa.

20 El término "casete" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia de polinucleótidos que se va a expresar. El casete se puede insertar en un vector. El casete incluye opcionalmente una secuencia reguladora para dirigir o modificar su expresión.

25 La expresión "proteína de la superficie celular" o "polipéptido de la superficie celular", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que se expresa, en su totalidad o en parte sobre la superficie de una célula. Este opcionalmente incluye fragmentos de polipéptidos que se presentan en células, así como polipéptidos o fragmentos de los mismos que se encuentran naturalmente sobre la superficie de una célula. En el contexto de una célula modificada para expresar una construcción vector que comprende un polipéptido casete de detección, en donde el polipéptido casete de detección es un polipéptido de la superficie celular, el marcador de la superficie celular no tiene que ser nativo con respecto a la célula en la que se expresa.

35 El término "LLC" se refiere a la leucemia linfocítica crónica, un tipo de leucemia de crecimiento lento. La LLC es la leucemia más común de los adultos con una expectativa de ~16.500 casos en América del Norte en 2008. Se pueden lograr remisiones con análogos de purina y terapia con anticuerpos monoclonales sin embargo, la enfermedad progresa invariablemente. La LLC es también conocida como leucemia linfoblástica crónica. La LLC-B es un subconjunto de la LLC.

40 El término "vector de calidad clínica" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un vector fabricado con procedimientos próximos a GMP o GMP y garantía de calidad probada.

45 El término "LMC" se refiere a la leucemia mieloide crónica, una leucemia que progresa lentamente en donde se elaboran la sangre glóbulos blancos en exceso en la médula ósea. El sello distintivo de esta enfermedad es la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 que conduce a la formación del oncogen Bcr-Abl. Esto se manifiesta por una rápida expansión de las células hematopoyéticas derivadas de médula ósea del linaje mieloide. La LMC es también conocida como leucemia mielógena crónica y leucemia granulocítica crónica.

50 Una "sustitución de aminoácidos conservativa" según se utiliza en la presente memoria, es aquella en la que un residuo de aminoácido es reemplazado por otro residuo de aminoácido sin abolir las propiedades deseadas de la proteína. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un aminoácido de uno de los siguientes grupos por otro aminoácido del mismo grupo: alanina (A), serina (S) y treonina (T); ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E); asparragina (N) y glutamina (Q); arginina (R) y lisina (L); isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

55 El término "casete de detección" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polinucleótido que dirige la expresión de una molécula que es útil para el enriquecimiento, la clasificación, el seguimiento y/o la destrucción de las células en las que se expresa. El casete de detección codifica un polipéptido que se expresa en la célula transducida o transfectada y que puede ser utilizado, como consecuencia, para detectar y/o aislar las células transducidas o transfectadas. El casete de detección se utiliza opcionalmente para determinar la eficacia de la transducción o la transfección de las células.

Según se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad suficiente" de la composición, construcción de vector, virus o célula de la presente solicitud es una cantidad suficiente para lograr, cuando se administra al sujeto, incluyendo un mamífero, por ejemplo un ser humano,

5 el efecto beneficioso o los resultados deseados, incluyendo resultados clínicos, y, como tal, una "cantidad eficaz" o un sinónimo de la misma depende del contexto en el que se está aplicando. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento del cáncer, es una cantidad de la composición, construcción de vector, virus o célula suficiente para conseguir una respuesta al tratamiento en comparación con la respuesta obtenida sin la administración de la composición, construcción de vector, virus o célula. La cantidad de un compuesto dado de la presente solicitud que
 10 corresponderá a dicha cantidad variará dependiendo de varios factores, tales como el agente administrado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad de la sujeto (p.ej., edad, sexo, peso) o anfitrión que se vaya a tratar, y similares, pero sin embargo se pueden determinar rutinariamente por un experto en la técnica. También, según se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición, construcción de vector, virus o célula de la presente descripción es una cantidad que produce un resultado beneficioso o deseado en un sujeto en comparación con un control. Según se define en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición, construcción de vector, virus o célula de la presente descripción puede ser determinada fácilmente por un experto por métodos de rutina conocidos en la técnica. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta
 15 terapéutica óptima.

El término "hibridar" se refiere a la interacción de unión no covalente específica de la secuencia con un ácido nucleico complementario.

20 Un "casete inmunomodulador" según se utiliza en la presente memoria, significa un polinucleótido que dirige la expresión de una molécula o polipéptido que potencia el efecto anti-tumoral de una célula transducida con IL-12. Una clase de moléculas inmunorreguladoras son las citoquinas. También se incluyen los compuestos que inhiben moléculas que suscitan antagonismo sobre la respuesta a IL-12. Por ejemplo, la IL-10 puede inhibir la IL-12, los compuestos que inhiben el efecto antagónico de IL-10 modularán positivamente la respuesta inmunitaria.

25 El término "respuesta inmunitaria" según se utiliza en la presente memoria puede hacer referencia a la activación de una o ambas de las células del sistema inmunitario tanto adaptativo como innatos de tal manera que pasen de un estado de reposo inactivo a un estado en el que son capaces de elaborar moléculas típicas de una respuesta inmunitaria activa .

30 La frase "inducir una respuesta inmunitaria", según se utiliza en la presente memoria se refiere a un método por el cual se activa una respuesta inmunitaria. La expresión "potenciar una respuesta inmunitaria" se refiere a aumentar una respuesta existente, pero inmunitaria.

35 El término "mayor riesgo de cáncer" según se utiliza en la presente memoria significa un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar un cáncer particular que el riesgo promedio de la población. Un sujeto puede tener un riesgo más alto debido a haber tenido previamente dicho cáncer particular y a tener un factor de riesgo genético para dicho cáncer particular.

40 El término "destruye" con respecto a las células transfectadas o transducidas se refiere a la inducción de la muerte celular a través de cualquiera de una variedad de mecanismos, incluyendo apoptosis, necrosis y autofagia. Por ejemplo un agente que es citotóxico destruye las células.

45 El término "leucemia" según se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier tipo de cáncer o síndrome precanceroso que se inicia en los tejidos que forman la sangre tales como la médula ósea. Se han caracterizado numerosas leucemias incluyendo LLA, LMA, LLC, y LMC. El suministro de una construcción de LV/IL-12 para modificar genéticamente la expresión de IL-12 en células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno eficaces también podría ser eficaz en un estado pre-canceroso si se hubieran identificado antígenos asociados a tumores dominantes para el cáncer en el futuro en ese caso y la respuesta inmunitaria del anfitrión se dirigiera
 50 contra ese antígeno.

Los términos "polinucleótido" y/o "secuencia de ácido nucleico" según se utilizan en la presente memoria se refieren a una secuencia de monómeros de nucleósidos o nucleótidos que consisten en bases naturales, azúcares y enlaces interazúcares (cadena principal). Los términos también incluyen secuencias modificadas o sustituidas que
 55 comprenden monómeros de origen no natural o partes de los mismos. Las secuencias de ácidos nucleicos de la presente solicitud pueden ser secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases de origen natural incluyendo adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas. Los ejemplos de tales bases modificadas incluyen aza y desaza adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina.

60 El término "polipéptido" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia de aminoácidos que consisten en residuos de origen natural, y residuos de origen no natural.

El término "promotor" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un sitio de reconocimiento en el ADN que

está unido por una ARN polimerasa. La polimerasa conduce la transcripción del transgén.

El término "identidad de secuencia" según se utiliza en la presente memoria se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de polipéptidos o dos secuencias de ácidos nucleicos. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con el propósito de una comparación óptima (p.ej., se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan a continuación. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, en ese caso las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones solapantes idénticas/número total de posiciones X100%). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264-2268, Modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora a los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con los parámetros del programa de nucleótidos NBLAST establecidos, p.ej., para la puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico de la presente solicitud. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con los parámetros del programa XBLAST establecidos, p.ej., para la puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la presente descripción. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como describen Altschul et al., 1997, en Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Alternativamente, se puede utilizar PSI-BLAST para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (p.ej., de XBLAST y NBLAST) (véase, p.ej. el sitio web de NCBI). El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar utilizando técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o sin permitir huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, se cuentan típicamente sólo las coincidencias exactas.

El término "sujeto" según se utiliza en la presente memoria incluye todos los miembros del reino animal incluyendo los mamíferos, adecuadamente los seres humanos incluidos los pacientes.

El término "sujeto que lo necesite" se refiere a un sujeto que podría beneficiarse del método, y, opcionalmente, se refiere a un sujeto con cáncer, tal como leucemia, u opcionalmente a un sujeto con un mayor riesgo de cáncer, tal como un sujeto que tiene previamente cáncer, un sujeto con un síndrome precanceroso o un sujeto con una fuerte disposición genética.

El término "transducción" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un método de introducción de una construcción de vector o una parte del mismo en una célula. En donde la construcción de vector está comprendida en un virus tal como, por ejemplo, un lentivirus, la transducción se refiere a la infección viral de la célula y la posterior transferencia e integración de la construcción del vector o parte del mismo en el genoma celular.

El término "tratar" o "tratamiento" según se utiliza en la presente memoria, significa administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones, células o construcciones de vectores de la presente solicitud y pueden consistir en una única administración, o, alternativamente, puede comprender una serie de aplicaciones.

Como se usa en la presente memoria, y como es bien sabido en la técnica, "tratamiento" o "tratar" también es un enfoque para la obtención de resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, el alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, la disminución del grado de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) de la enfermedad, la prevención de la propagación de la enfermedad, el retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Adicionalmente cualquiera de los métodos de tratamiento o usos descritos en la presente memoria se puede formular solo o para la administración simultánea con otros agentes o terapias.

El término "construcción de vector", según se utiliza en la presente memoria significa un polinucleótido recombinante que comprende un vector alternativamente referido como cadena principal de vector y al menos un casete de codificación. Una construcción de vector está opcionalmente comprendida en un virus, tal como un lentivirus. El término "vector" utilizado en la presente memoria se refiere a un medio por el cual los polinucleótidos se pueden introducir en una célula o anfitrión.

Construcciones de vector y virus

La presente descripción proporciona en un aspecto una construcción de vector o virus tal como un lentivirus que comprende un vector de suministro y un casete de expresión de IL-12. En una realización, el vector de suministro es una cadena principal de lentivirus o vector lentiviral (LV).

Casete de expresión de interleuquina-12 (IL-12)

La interleuquina-12 es una citoquina heterodimérica con múltiples efectos biológicos sobre el sistema inmunitario. Se compone de dos subunidades, p35 y p40, ambas las cuales son necesarias para la secreción de la forma activa de IL-12, p70. La interleuquina-12 actúa sobre las células dendríticas (DC), conduciendo a un aumento de la maduración y la presentación de antígenos, que puede permitir el inicio de una respuesta de células T a los antígenos específicos del tumor.

En una realización, el casete de expresión de IL-12 comprende un polinucleótido que dirige la expresión del polipéptido de IL-12. Se puede utilizar cualquier polipéptido de IL-12 incluyendo variantes y derivados de moléculas de IL-12 conocidas. En una realización preferida, la IL-12 es IL-12 humana. En otra realización, la IL-12 es IL-12 murina.

En una realización el polinucleótido comprende la secuencia de ambas subunidades de IL-12 subunidades, p35 y p40, separadas por una secuencia IRES que permite la expresión de múltiples transgenes a partir de un único transcrito. En otras realizaciones, el polinucleótido dirige la expresión de un polipéptido de fusión de IL-12 que conserva la actividad de IL-12. En una realización, el polinucleótido que dirige la expresión de IL-12 comprende un ADNc que codifica una fusión del polipéptido de IL-12 humano obtenido de InvivoGen (pORF con IL-12elasti (p40::p35)). En una realización, el polinucleótido dirige la expresión de un polipéptido de IL-12 que comprende todo o parte del SEQ ID NO: 4 o 5, y/o una variante de un fragmento del mismo que conserva la actividad de IL-12. En otra realización, el polinucleótido dirige la expresión de un polipéptido de fusión de IL-12 que tiene al menos 70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-99,9% o más a la porción de IL-12 del SEQ ID NO: 4 o 5 y conserva la actividad de IL-12. La actividad de IL-12 se determina por ejemplo mediante la evaluación de la activación del receptor de IL-12 en un análisis basado en células.

Un experto en la técnica comprenderá que los residuos no críticos se pueden eliminar, y se pueden mutar sin efecto sobre la IL-12. También se contemplan polinucleótidos que dirigen la expresión de análogos de polipéptidos de IL-12.

Vectores de suministro

Un experto en la técnica apreciará que se emplea positivamente una variedad de vectores de suministro y vehículos de expresión para introducir una molécula de ADN modificada en una célula. Los vectores que son útiles comprenden lentivirus, oncoretrovirus, plásmidos de expresión, adenovirus y virus adeno-asociados. Otros vectores de suministro que son útiles comprenden virus del herpes simple, transposones, virus vaccinia, virus del papiloma humano, virus de la inmunodeficiencia en simios, HTLV, virus espumoso humano y variantes de los mismos. Otros vectores que son útiles comprenden espumavirus, retrovirus tipo B de mamíferos, retrovirus tipo C de mamíferos, retrovirus de tipo C aviar, retrovirus de tipo D de mamíferos, retrovirus tipo HTLV/BLV, y lentivirus.

Se han empleado vectores tales como los enumerados anteriormente para introducir moléculas de ADN en las células para su uso en terapia génica. Los ejemplos de los vectores utilizados para expresar ADN en las células incluyen los vectores descritos por: Kanazawa T, Mizukami H, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Nishino H, Takeuchi K, Kitamura K, Ichimura K, Ozawa K. Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice. *Gene Ther.* 2003 Ene; 10(1):51-8. Fukui T, Hayashi Y, Kagami H, Yamamoto N, Fukuhara H, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J. J Suicide gene therapy for human oral squamous cell carcinoma cell lines with adeno-associated virus vector. *Oncol Oral.* 2001 Abr; 37(3): 211-5.

Vectores retrovirales

El vector de suministro incluido en la construcción de vector o virus aislado de acuerdo con la reivindicación 1 es un vector lentiviral. Los vectores lentivirales (LV), un subconjunto de retrovirus, transducen una amplia gama de tipos de células en división y células que no están en división con una alta eficiencia, que confiere, una expresión estable a largo plazo del transgén²⁵⁻²⁷.

El uso de técnicas de transferencia de genes basadas en lentivirus se basa en la producción in vitro de partículas lentivirales recombinantes que llevan un genoma viral con muchas delecciones en el que se aloja el transgén de interés. En particular, los lentivirus recombinantes se recuperan a través de la expresión simultánea *en trans* en una

línea celular permisiva de (1) las construcciones de empaquetamiento, es decir, un vector que expresa los precursores Gag-Pol junto con Rev (alternativamente expresados en trans); (2) un vector que expresa un receptor de la envoltura, generalmente de naturaleza heteróloga; y (3) el vector de transferencia, que consiste en el ADNc viral privado de todos los marcos de lectura abiertos, pero que conservan las secuencias necesarias para la replicación, encapsidación, y expresión, en el que se insertan las secuencias que se van a expresar.

En una realización, el vector lentiviral comprende uno o más de una repetición terminal larga (LTR) 5', la secuencia señal del VIH, el sitio de empalme 5' de la señal Psi del VIH (SD), el elemento delta-GAG, el Elemento de Respuesta a Rev (RRE), el sitio de empalme 3' (SA), el promotor del factor de Elongación alfa-1 (EF), y la LTR de auto-inactivación 3' (SIN-LTR). El vector lentiviral comprende opcionalmente un tracto de polipurina central (cPPT; SEQ ID NO: 2) y un elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE; SEQ ID NO: 3). En una realización adicional, el vector lentiviral comprende una cadena principal de pHR'. En ciertas realizaciones, la cadena principal de pHR' comprende, por ejemplo, lo que se proporciona a continuación.

En una realización, se utiliza el vector lentiviral Lentigen descrito por Lu, X. et al. en *Journal of gene medicine* (2004) 6:963-973 para expresar las moléculas de ADN y/o transducir células.

En una realización, el vector lentiviral comprende una repetición terminal larga 5' (LTR), la secuencia señal del VIH, el sitio de empalme 5' de la señal Psi del VIH (SD), el elemento delta-GAG, el Elemento de Respuesta a Rev (RRE), el sitio de empalme 3' (SA), el promotor del factor de Elongación alfa-1 (EF) y la LTR de auto-inactivación 3' (SIN-LTR). Será fácilmente evidente para un experto en la técnica que, opcionalmente, una o más de estas regiones está sustituida por otra región que realiza una función similar.

Se requiere que la IL-12 sea expresada a niveles suficientemente altos. La expresión del transgen es accionada por una secuencia promotora. Opcionalmente, el vector lentiviral comprende un promotor de CMV. En otra realización, el promotor es el promotor del factor de elongación alfa 1 (EF). Una persona experta en la técnica estará familiarizada con numerosos promotores que serán adecuados en las construcciones de vector descritas en la presente memoria.

Se pueden utilizar elementos potenciadores para aumentar la expresión de moléculas de ADN modificados o para aumentar la eficacia de la integración lentiviral. En una realización, el vector lentiviral comprende además una secuencia nef. En una realización preferida, el lentiviral comprende adicionalmente una secuencia cPPT que mejora la integración del vector. cPPT actúa como un segundo origen de la síntesis de la hebra (+) del ADN e introduce un solapamiento parcial de la hebra en el medio de su genoma nativo del VIH. La introducción de la secuencia cPPT en la cadena principal del vector de transferencia aumentó fuertemente el transporte nuclear y la cantidad total de genoma integrado en el ADN de las células diana. En una realización preferida alternativa, el vector lentiviral comprende adicionalmente un Elemento Regulador Postranscripcional de marmota (WPRE). El WPRE actúa a nivel transcripcional, mediante la promoción de la exportación nuclear de los transcritos y/o el aumento de la eficacia de la poliadenilación del transcrito naciente, lo que aumenta la cantidad total de ARNm en las células. La adición de WPRE a los vectores lentivirales da como resultado una mejora sustancial en el nivel de la expresión del transgen a partir de varios promotores diferentes, tanto in vitro como in vivo. En una realización preferida adicional, el vector lentiviral comprende tanto una secuencia cPPT como una secuencia WPRE. En otra realización adicional más, el vector lentiviral comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-99,9% o más de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 2 y/o el SEQ ID NO: 3. El vector también comprende, en una realización alternativa, una secuencia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que permite la expresión de múltiples polipéptidos a partir de un único promotor.

Además de las secuencias IRES, son útiles otros elementos que permiten la expresión de múltiples polipéptidos. En una realización, el vector comprende múltiples promotores que permiten la expresión de más de un polipéptido. En otra realización, el vector comprende un sitio de escisión de la proteína que permite la expresión de más de un polipéptido. Los ejemplos de los sitios de escisión de proteína que permiten la expresión de más de un polipéptido comprenden los enumerados en los siguientes artículos:

Retroviral vector-mediated expression of HoxB4 in hematopoietic cells using a novel coexpression strategy. Klump H, Schiedmeier B, Vogt B, Ryan M, Ostertag W, Baum C. *Gene Ther.* 200; 8(10):811-7; A picornaviral 2A-like sequence-based tricistronic vector allowing for high-level therapeutic gene expression coupled to a dual-reporter system Mark J. Osborn, Angela Panoskaltis-Mortari, Ron T. McElmurry, Scott K. Bell, Dario A.A. Vignali, Martin D. Ryan, Andrew C. Wilber, R. Scott McIvor, Jakub Tolar y Bruce R. Blazar. *Molecular Therapy* 2005; 12 (3), 569-574; Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. Szymczak AL, Vignali DA. *Expert Opin Biol Ther.* 2005; 5(5):627-38; Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA. *Nat Biotechnol.* 2004;22(5):589-94. Será fácilmente evidente para un experto en la técnica que son útiles otros elementos que permiten la expresión de múltiples polipéptidos que se identifican en el futuro y se pueden utilizar en los vectores de la presente descripción.

En ciertas realizaciones, el vector lentiviral es un vector de calidad clínica.

Elementos reguladores virales

5 Los elementos reguladores virales son componentes de vehículos de suministro utilizados para introducir moléculas de ácido nucleico en una célula anfitriona. Los elementos reguladores virales son opcionalmente elementos reguladores retrovirales. Por ejemplo, los elementos reguladores virales pueden ser las secuencias de LTR y gag de HSC1 o MSCV. Los elementos reguladores retrovirales pueden ser de lentivirus o pueden ser secuencias heterólogas identificadas de otras regiones genómicas.

10 Un experto en la técnica también apreciará que a medida que se identifican otros elementos reguladores virales, estos pueden ser utilizados con las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción.

Casete de detección

15 En ciertas realizaciones, la construcción de vector comprende un casete de detección. El casete de detección comprende un polinucleótido que dirige la expresión de una molécula que es útil para el enriquecimiento, la clasificación, el seguimiento y/o la destrucción de las células en las que se expresa. El casete de detección codifica un polipéptido que se expresa en la célula transducida o transfectada y se puede utilizar, como consecuencia, para detectar y/o aislar las células transducidas o transfectadas. El casete de detección se utiliza opcionalmente para determinar la eficiencia de la transducción o la transfección de las células.

20 En una realización, el casete de detección codifica un polipéptido que protege de un fármaco de selección tal como neomicina fosfotransferasa o G418. En otra realización, el casete de detección codifica una proteína fluorescente tal como GFP. También se pueden utilizar otras proteínas fluorescentes. En una realización adicional, el casete de detección es un marcador de la superficie celular tales como CD19, CD19 truncado, CD20, CD24 humano, HSA murino, CD25 humano (huCD25), una forma truncada del receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR), CD34 truncado o receptor de la eritropoyetina (EpoR). En ciertas realizaciones, el polipéptido del casete de detección se expresa en exceso sustancialmente en las células transducidas de manera que estas células son elegidas como diana preferentemente. En otras realizaciones, el polipéptido del casete de detección no se expresa sensiblemente en el tipo de célula que va a ser transducida o transfectada.

30 Como se describe a continuación, el polipéptido del casete de detección se puede utilizar para aislar células transducidas por métodos tales como la citometría de flujo.

35 En una realización, el casete de detección comprende una molécula de CD19 o fragmento de la misma. En otra realización preferida, la construcción comprende un polinucleótido de detección incorporado a pHR'-cppt-EF-IRES-W-SIN, pHR'-cppt-EF-huCEA-IRES-hCD19-W-SIN o pHR'-cppt-EF-HER/neuIRES-hCD19-W-SIN. Además será fácilmente evidente para un experto en la técnica que, opcionalmente, uno o más de estos elementos pueden ser añadidos a o sustituidos por otras regiones que realizan funciones similares.

40 Casete inmunomodulador

45 Se puede obtener un mejor efecto antitumoral con el uso de moléculas inmunomoduladoras específicas. Una clase de moléculas inmunorreguladoras son las citoquinas. Las citoquinas son integrantes de los sistemas inmunitarios tanto innato como adquirido. Pueden alterar el equilibrio de respuestas celulares y humorales, alterar el cambio de clase de los linfocitos B y modificar las respuestas innatas.

En una realización, el casete inmunomodulador comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que modula una célula inmunitaria, opcionalmente una célula dendrítica o una célula T, opcionalmente una célula T CD4+.

50 En una realización, la molécula inmunomoduladora útil para promover el efecto anti-tumoral es RANKL. RANKL es una molécula que prolonga la vida útil de las DC de una forma autocrina. CD40L que mejora la capacidad estimuladora de las DC, también es útil para promover el efecto antitumoral de vacunas de DC y de células tumorales. Además son útiles otras numerosas citoquinas incluyendo IL-2, IL-7, IL-15, IL-18 e IL-23. Un experto en la técnica reconocería que otras moléculas inmunomoduladoras, incluyendo moléculas que promueven función APC son adecuados para su uso en las construcciones de la presente solicitud.

60 En otra realización, el casete inmunomodulador comprende un polinucleótido que codifica o dirige la expresión de una molécula que inhibe la modulación a la baja de IL-12, por ejemplo inhibe la IL-10. En una realización, la molécula es un polipéptido de IL-10 dominante negativo. En otra realización, la molécula es un inhibidor de molécula pequeña. En otra realización, la molécula es un ARNip o ARNhc desactiva la expresión génica de IL-10.

Componentes de seguridad

La proteína de la superficie celular - Uso de inmunotoxinas para destruir células transducidas

En ciertas realizaciones, se suministra una proteína de la superficie celular (marcador) referida en la presente memoria como casete de detección, tal como CD19, CD20 HSA, LNGFR truncado, CD34, CD24 o CD25 a las células diana que aclara más selectivamente estas células *in vitro* e *en vivo* mediante la administración de una inmunotoxina (anticuerpo conjugado con una toxina) dirigido contra la proteína de la superficie celular. El término "inmunotoxina" según se utiliza en la presente memoria representa un anticuerpo o fragmento del mismo que es citotóxico y/o un anticuerpo o fragmento del mismo que está fusionado a un agente tóxico. Las inmunotoxinas se describen en esta solicitud y son conocidos en la técnica, por ejemplo, en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20070059275.

Muchas inmunotoxinas están aprobadas para su uso en seres humanos. En una realización, la inmunotoxina es un anticuerpo monoclonal 19 anti-Tac (AT) murino fusionado a saporina (SAP)¹⁰⁰ una toxina que daña irreversiblemente los ribosomas por la escisión de moléculas de adenina del ARN ribosomal.²¹ Los autores de la presente invención han demostrado tanto *in vitro* como *en vivo* que el complejo AT-SAP (ATS) se dirige específicamente y destruye las células transducidas con retrovirus que expresan huCD25. El uso de inmunotoxinas para destruir las células transducidas se describe en la solicitud CA Vector Encoding Therapeutic Polypeptide and Safety Elements to Clear Transduced Cells, presentada el 27 de marzo, 2007.

Polinucleótidos activadores

Otros componentes de seguridad que se pueden introducir en las construcciones de vector descritas se describen en la solicitud de los Estados Unidos 11/559.757, THYMIDYLATE KINASE MUTANTS AND USES THEREOF y en la Solicitud de los Estados Unidos Núm. 12/052.565. En una realización, la construcción lentiviral comprende adicionalmente un polinucleótido que codifica un polipéptido activador que convierte un profármaco en un fármaco, opcionalmente un polinucleótido tmpk modificado. En una realización, el polinucleótido activador comprende un polinucleótido tmpk con al menos 80% de identidad de secuencia con un polinucleótido tmpk modificado, opcionalmente las secuencias enumeradas a continuación.

La faceta de seguridad de la terapia génica suicida se basa en el suministro eficaz y la expresión, consistente estable de genes componentes de seguridad y terapéuticos.

Variantes y análogos de casetes de expresión

En el contexto de un polipéptido, el término "análogo" según se utiliza en la presente memoria incluye cualquier polipéptido que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos sustancialmente idéntica a cualquiera de los polipéptidos de tipo salvaje expresadas por el casete de expresión, por ejemplo, IL-12 o IL-12 mutante, en el que uno o más residuos han sido sustituidos conservativamente por un residuo funcionalmente similar y que muestre la capacidad de activar en el contexto de IL-12, el receptor de IL-12 similar a la IL-12 de tipo salvaje o a los mutantes de IL-12. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrófobo) tal como alanina, isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un residuo polar (hidrófilo) por otro tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparragina, entre glicina y serina, la sustitución de un residuo alcalino tal como lisina, arginina o histidina por otro, o la sustitución de un residuo ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro. La expresión "sustitución conservativa" también incluye el uso de un residuo derivado químicamente en lugar de un residuo no derivatizado siempre que dicho polipéptido muestre la actividad requerida.

En el contexto de un polipéptido, el término "derivado", según se utiliza aquí se refiere a un polipéptido que tiene uno o más residuos químicamente derivatizados mediante reacción de un grupo lateral funcional. Tales moléculas derivatizadas incluyen por ejemplo, aquellas moléculas en las que los grupos amino libres han sido derivatizados para formar hidrocloruros de amina, grupos p-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres se pueden derivatizar para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres se pueden derivatizar para formar derivados O-acilados u O-alkilados. El nitrógeno de la histidina del imidazol se puede derivatizar para formar N-im-bencilhistidina. También se incluyen como derivados aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo: la 4-hidroxi prolina se puede sustituir por prolina; la 5-hidroxi lisina se puede sustituir por lisina; la 3-metilhistidina se puede sustituir por histidina; la homoserina se puede sustituir por serina; y la ornitina se puede sustituir por lisina. Los polipéptidos de la presente descripción también incluyen cualquier polipéptido que tenga una o más adiciones y/o deleciones de residuos con respecto a la secuencia de tipo salvaje, siempre que se mantenga la actividad requerida.

Los métodos de elaboración de proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica y también se describen en la presente memoria.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria también pueden comprender análogos de nucleótidos que pueden ser más adecuados como reactivos terapéuticos o experimentales. El ácido nucleico puede contener también grupos tales como grupos informadores, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un

ácido nucleico.

Las moléculas de ácido nucleico se pueden construir utilizando la síntesis química y reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico de la descripción o un fragmento de las mismas, se pueden sintetizar químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de manera diversa diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas.

Virus aislado

En una realización, las construcciones retrovirales y lentivirales se empaquetan en partículas virales. Los métodos para preparar virus son conocidos en la técnica y se describen en la presente memoria. En una realización, la solicitud proporciona un virus aislado, opcionalmente, un lentivirus que comprende la construcción de vector.

Los métodos de aislamiento de virus también se conocen en la técnica y se describen adicionalmente en la presente memoria.

Métodos para expresar IL-12 en las células y aislamiento de las células

Se describen métodos para expresar IL-12 en las células a un nivel umbral o por encima del mismo. Por consiguiente, en un aspecto, la descripción proporciona un método de expresión de IL-12 en una célula por encima de un nivel umbral.

Los polinucleótidos se pueden incorporar a un vector de expresión apropiado que asegure una buena expresión de la IL-12 y/u otros casetes de expresión descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los vectores descritos en la presente memoria son adecuados.

Los vectores de expresión posibles incluyen pero no se limitan a cósmidos, plásmidos, o virus modificados (p.ej. retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), siempre que el vector sea compatible con la célula anfitriona utilizada. Los vectores de expresión son "adecuados para la transformación de una célula anfitriona", lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico y secuencias reguladoras seleccionadas basándose en células anfitrionas que se van a utilizar para la expresión, que está operativamente unida a la molécula de ácido nucleico. Se pretende que unido operativamente o unido operablemente signifique que el ácido nucleico está unido a secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión del ácido nucleico.

Por lo tanto, la descripción incluye un vector de expresión recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria, o un fragmento de la misma, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de la proteína insertada.

Las secuencias reguladoras adecuadas pueden derivar de una variedad de fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamífero, o de insecto (por ejemplo, véanse las secuencias reguladoras descritas por Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). La selección de secuencias reguladoras apropiadas depende de la célula anfitriona elegida como se comenta a continuación, y se puede llevar a cabo fácilmente por un experto en la técnica. Los ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen: un promotor y un potenciador de la transcripción o una secuencia de unión a la ARN polimerasa, una secuencia de unión al ribosoma, que incluye una señal de inicio de la traducción. Además, dependiendo de la célula anfitriona elegida y del vector empleado, se pueden incorporar al vector de expresión otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores, y secuencias que confieren capacidad de inducir la transcripción.

Los vectores de expresión recombinantes se pueden introducir en células anfitrionas para producir una célula anfitriona transformada. Se pretende que los términos "transformadas con", "transfectadas con", "transformación" "transducidas" y "transfección" abarquen la introducción de ácido nucleico (p.ej. un vector o construcción de vector) en una célula mediante uno de los muchos mecanismos posibles conocidos en la técnica. La expresión "en condiciones adecuadas que permitan la transducción o transfección de la célula" se refiere, por ejemplo, a condiciones de cultivo ex vivo, tales como la selección de un medio apropiado, las concentraciones de los agentes y la duración del tiempo de contacto que sean adecuados para transfectar o transducir el anfitrión particular. Las condiciones adecuadas son conocidas en la técnica y/o se describen en la presente memoria. Se pretende que los términos "célula anfitriona transformada" o "célula anfitriona transducida" según se utilizan en la presente memoria incluyan también células susceptibles de glicosilación que se han transformado con un vector de expresión recombinante descrito en la presente memoria. Las células procarióticas se pueden transformar con ácido nucleico mediante, por ejemplo, electroporación o transformación mediada por cloruro de calcio. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser introducido en células de mamífero mediante técnicas convencionales tales como co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofectina,

electroporación o microinyección. Los métodos adecuados para transformar y transfectar células anfitrionas se pueden encontrar en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001), y otros libros de texto de laboratorio. Los métodos adecuados para la transducción de células son conocidos en la técnica y también se describen en la presente memoria.

5 Las construcciones de vectores se introducen en células que se utilizan para el trasplante o se introducen directamente *in vivo* en los mamíferos, preferiblemente seres humanos. Las construcciones de vectores se introducen típicamente en células *ex vivo* utilizando métodos conocidos en la técnica. Los métodos para introducir construcciones de vectores comprenden transfección, infección, electroporación. Estos métodos emplean
10 opcionalmente liposomas o compuestos de tipo liposomas. La introducción *in vivo* incluye opcionalmente la inyección intravenosa y/o la inyección intratumoral. Estos métodos se describen más completamente en otra parte.

En ciertas realizaciones, la célula se pone en contacto con una construcción de vector de la composición y/o un virus aislado descrito en la presente memoria, por ejemplo un virus aislado que comprende un vector lentiviral y una
15 casete de expresión de IL-12, en condiciones que permiten la transducción o transfección de la célula. Los métodos de transducción de células son bien conocidos en la técnica.

En una realización, el método de expresión de IL-12 en una célula comprende poner en contacto la célula con una composición y/o construcción de vector descritas en la presente memoria, por ejemplo que comprende un vector
20 lentiviral y un casete de expresión de IL-12, en condiciones que permiten la transducción o transfección de la célula.

En otras realizaciones, las células se transducen opcionalmente con construcciones retrovirales que dirigen la expresión de IL-12 y/o casetes de expresión adicionales descritos en la presente memoria. Los métodos de transducción de células son bien conocidos en la técnica. Los métodos de transducción de células con vectores
25 lentivirales también se describen en la presente memoria.

En otra realización, el método comprende adicionalmente el aislamiento de la célula transducida o una población de células transducidas.

30 Después de la transducción o transfección con construcciones de vectores que comprenden un casete de expresión de IL-12, y/o un polinucleótido de casete de detección, las células que expresan estas moléculas se aíslan opcionalmente por medio de una variedad de medios conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, las células se aíslan mediante clasificación de células o citometría de flujo utilizando un anticuerpo para el marcador de selección codificado por el casete de detección. Además clasificación de células es útil para aislar células modificadas en las
35 que el casete de detección es una proteína fluorescente tal como EGFP.

En una realización las células se aíslan del medio de transducción o transfección y/o de la preparación viral. Por ejemplo, las células pueden ser centrifugadas y/o lavadas con una solución salina tamponada. En consecuencia, las células pueden comprender una población de células que comprende células transducidas y no transducidas. En
40 ciertas realizaciones, la población de células comprende al menos 1%, 2-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-99% o más de 99% de células transducidas o transfectadas con IL-12.

Las células que expresan los polinucleótidos de la presente descripción, en una realización alternativa, son aislados utilizando la clasificación magnética. Adicionalmente, las células se pueden aislar por selección de fármacos. En una
45 realización, se introduce en las células un vector que comprende un gen de resistencia a un fármaco y un polinucleótido de la presente descripción. Los ejemplos de genes de resistencia a fármacos incluyen, pero no se limitan a, el gen de resistencia a neomicina, el gen de resistencia a blastidina (Bsr), el gen de resistencia a higromicina (Hph), el gen de resistencia a puromicina (Pac), el gen de resistencia a Zeocin (Sh ble), FHT, el gen
50 resistencia a bleomicina y el gen de resistencia a ampicilina. Después de la transducción o transfección, las células modificadas que incluyen el gen de resistencia a un fármaco se seleccionan mediante la adición del fármaco que es inactivado por el gen de resistencia al fármaco. Las células que expresan el gen de resistencia a un fármaco sobreviven mientras que las células no transfectadas o no transducidas se destruyen. Un experto en la técnica estará familiarizado con los métodos y reactivos requeridos para aislar las células que expresan los polinucleótidos
55 deseados.

En una realización adicional, se detiene el crecimiento de las células transducidas. Se pueden utilizar varios métodos para detener el crecimiento de las células. En una realización, se detiene el crecimiento de las células transfectadas o transducidas por medio de irradiación. El término "detención del crecimiento" se refiere al hecho de
60 inhibir la división celular. Un experto en la técnica reconocerá que la dosis de irradiación adecuados para la detención del crecimiento de una célula o población de células puede variar de acuerdo con el tipo de célula y/o número de células. En una realización, la dosis es de aproximadamente 75-150G. En otra realización, para la LMA la dosis de radiación es de aproximadamente 75G.

Células anfitrionas

La descripción también proporciona en un aspecto una célula (incluyendo, por ejemplo una célula aislada *in vitro*, una célula *en vivo*, o una célula tratada *ex vivo* y devuelta a un sitio *in vivo*) expresando y/o secretando la IL-12 por encima de un límite umbral. En una realización, la célula es transducida con una construcción de vector, virus o la composición descritos en la presente memoria.

Las células transfectadas con una molécula de ácido nucleico tal como una molécula de ADN, o transducidas con la molécula de ácido nucleico tal como un vector de virus con ADN o ARN, se utilizan opcionalmente, por ejemplo, en trasplantes de médula ósea o de células de sangre de cordón umbilical de acuerdo con los mecanismos conocidos en la técnica.

Se puede utilizar cualquier célula para la transducción con las construcciones de vector descritas en la presente memoria para obtener una célula que expresa IL-12 por encima del nivel umbral. En una realización, la célula es una célula cancerosa. En una realización, la célula cancerosa es una célula de cáncer primario. En una realización adicional, la célula de cáncer primario deriva de un sujeto. La célula cancerosa es opcionalmente una célula alogénica o autóloga. La célula cancerosa que va a ser transducida deriva opcionalmente de, se propaga a partir de o se clona a partir de una célula cancerosa obtenida de un sujeto. En una realización, la célula cancerosa se obtiene del sujeto por medio de biopsia. Alternativamente, la célula cancerosa se puede obtener de una muestra de sangre, por ejemplo en el caso de una leucemia, cuando el tipo de célula enferma está presente en la sangre periférica. Los métodos para aislar las células cancerosas de una muestra de sangre son conocidos en la técnica y/o se describen en la presente memoria.

Cualquier célula cancerosa que puede ser transducida o transfectada es un anfitrión adecuado para la transducción o transfección utilizando una composición o construcción de vector de la solicitud. En una realización, la célula cancerosa es una célula de leucemia. En una realización, la célula de leucemia es una célula de leucemia linfoblástica aguda (LLA), una célula de leucemia linfoblástica crónica (LLC), una célula de leucemia mieloide crónica (LMC), o una célula de leucemia mieloide aguda (LMA). En ciertas realizaciones, la célula cancerosa deriva de un cáncer que se caracteriza por o puede exhibir períodos de remisión. En ciertas realizaciones, la célula cancerosa es una célula de cáncer metastásico. En otras realizaciones, la célula cancerosa es una célula de linfoma, mieloma, tumor de pulmón, ovario, próstata, mama, melanoma, colon, vejiga, hígado, páncreas, tiroides, cáncer de cabeza o cuello. El sistema inmunitario es capaz de buscar las células que residen en casi todas las partes del cuerpo y por lo tanto todos los cánceres podrían ser susceptibles de este enfoque incluyendo: leucemias, linfomas, mielomas, tumores de pulmón, ovario, próstata, mama, melanoma, colon, vejiga, hígado, páncreas, tiroides, cabeza y cuello.

Opcionalmente se transducen o transfectan líneas celulares. Por ejemplo, opcionalmente se transducen por ejemplo células T Jurkat de leucemia de células T humanas, células K562 eritro-leucémicas humanas, células CES1, OCIAML1, OCIAML2, y Raji con los polinucleótidos de la descritos en la presente memoria. Raji es una línea de linfoma de Burkitt, OCI AML 1 y 2 son líneas de leucemia mielógena aguda, CES1 es una leucemia mielógena crónica.

Una célula cancerosa expresa antígenos asociados a tumores y la introducción de IL-12 y opcionalmente moléculas inmunomoduladoras aumenta la respuesta inmunitaria cuando la célula tumoral se introduce en el sujeto como demuestran los autores de la presente invención. En una realización, la célula tumoral es transducida con una construcción lentiviral que comprende un casete de IL-12 y, opcionalmente, un casete inmunomodulador, en donde el casete inmunomodulador comprende un polinucleótido que codifica una molécula que induce las células DC y/o las células T. Las células cancerosas son vehículos atractivos para la expresión de IL-12 ya que la respuesta inmunitaria es autolimitante. Las células cancerosas transducidas provocan una respuesta inmunitaria que conduce a la erradicación de la célula inicial. De ese modo los niveles de IL-12 son auto-limitantes.

Las composiciones y construcciones de vector descritas en la presente memoria se introducen de manera útil en cualquier tipo de célula *ex vivo*. *Las composiciones y construcciones de vector descritas en la presente memoria también se pueden introducir en cualquier tipo de célula in vivo.*

Nivel umbral

Los autores de la presente invención han demostrado que un número mínimo de células cancerosas que expresan al menos una cantidad umbral de IL-12 puede inducir y/o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto. La respuesta inmunitaria en algunas realizaciones, conduce a la pérdida de las células cancerosas no transducidas.

En una realización, el nivel umbral está en el nivel de al menos 1.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12. En otra realización, el nivel umbral es de al menos 1.500 a 2.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 2.500-5.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 5.000 a 7.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 7.500 a 10.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 10.000-12.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 12.500 a 15.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 15.000-17.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 17.500-20.000

pg/ml/10⁶ células/2 horas o al menos 20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12.

En otra realización, una población de células comprende células que secretan al menos aproximadamente 1.500-2.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 2.500-5.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 5.000-7.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 7.500-10.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 10.000-12.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 12.500-15.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 15.000-17.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, 17.500-20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas o al menos 20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12. En otras realizaciones, la población de células comprende células que secretan al menos aproximadamente 20.000-40.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12. Un experto en la técnica entendería que cada célula podría secretar cantidades variables de IL-12. La población puede incluir células que secretan menos o más de los números enumerados en la presente memoria o un umbral dado. Las células transducidas en su conjunto comprenden un número suficiente de células secretoras de IL-12, que secretan IL-12 por encima del nivel umbral de tal manera que las DC se activan.

La población de células puede comprender células transducidas y no transducidas y/o transfectadas y no transfectadas. En una realización, al menos 0,5%, 1%, 2-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-95%, 95-99% o más del 99% de las células de la población de células son transducidas o transfectadas y/o expresan IL-12.

En una realización preferida, la población de células comprende 1% de células transducidas que secretan 20.000 pg/10⁶ células/2 horas.

El nivel de expresión de IL-12 se puede determinada por medio de numerosos métodos que incluyen métodos conocidos en la técnica y los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo los niveles de IL-12 se pueden determinar mediante ELISA, análisis de esferas de citoquinas, tinción intracelular, HPLC y MS/MS, o ELISPOT.

Composiciones

La solicitud describe composiciones que comprenden un casete de expresión de IL-12 y un vector lentiviral tal como se describe en la presente memoria. El vector es para proporcionar una molécula de codificación de ácido nucleico (p.ej. el casete de expresión) a un sujeto de tal manera que la expresión de la molécula en las células proporcione la actividad biológica del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico codificante a esas células. Un ácido nucleico codificante, según se utiliza en la presente memoria significa un ácido nucleico o polinucleótido que comprende los nucleótidos que especifican la secuencia de aminoácidos, o una porción de la misma, de la proteína correspondiente. Una secuencia codificante puede comprender un codón de inicio y/o una secuencia de terminación.

En otras realizaciones, la composición comprende células modificadas con las construcciones de vector descritas en la presente memoria. Tales células modificadas se pueden administrar por vía intravenosa utilizando métodos conocidos en la técnica i.p., i.v., por vía intratumoral, inyecciones estereotácticas a una variedad de sitios, inyecciones directas, por vía intramuscular, etc.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción utilizadas para tratar pacientes que tienen enfermedades, trastornos o estados físicos anómalos podrían incluir un portador, un auxiliar o un excipiente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas se administran opcionalmente por medio de métodos *ex vivo* e *in vivo* tales como electroporación, microinyección de ADN, suministro de ADN en liposomas, y vectores de virus que tienen genomas de ARN o ADN, incluyendo vectores de retrovirus, vectores de lentivirus, vectores de adenovirus y vectores de virus adenoasociados (AAV), virus del bosque Semliki. También son útiles los derivados o los híbridos de estos vectores.

Las dosificaciones que se van a administrar dependen de las necesidades del paciente, del efecto deseado y de la ruta de administración elegida. Los casetes de expresión se introducen opcionalmente en las células o sus precursores utilizando vehículos de suministro *ex vivo* o *in vivo* tales como liposomas o vectores de virus con ADN o ARN. También se introducen opcionalmente en estas células utilizando técnicas físicas tales como métodos de microinyección o químicos tales como la co-precipitación.

Las composiciones farmacéuticas se preparan típicamente por métodos conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se administra a los pacientes, y de tal manera que se combina una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA).

Sobre esta base, las composiciones farmacéuticas pueden incluir un compuesto o sustancia activos, tal como una

molécula de ácido nucleico, asociada con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y contenidos en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isoosmóticas con los fluidos fisiológicos. Los métodos de combinación de los casetes de expresión con los vehículos o de combinación de los mismos con diluyentes son bien conocidos por los expertos en la técnica. La composición podría incluir un agente de direccionamiento para el transporte del compuesto activo a los sitios especificados dentro de las células.

Métodos para inducir/aumentar las respuestas inmunitarias y Métodos de tratamiento

Los métodos descritos en la presente memoria son útiles para inducir y potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En una realización, el sujeto tiene cáncer. En otra realización, el sujeto está en remisión. En una realización adicional, el sujeto tiene un mayor riesgo de cáncer.

En una realización, la descripción proporciona un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende la administración de una célula o población de células transducidas descritas en la presente memoria o una composición que comprende dichas células.

En otra realización, la descripción proporciona un método para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria de memoria en un sujeto.

En una realización, la respuesta inmunitaria inducida o potenciada es una respuesta inmunitaria mediada por células T CD4+.

La descripción también proporciona un método de suministro de IL-12 a un sujeto para mejorar el tratamiento del cáncer que comprende:

- la generación de una célula secretora de IL-12 en donde la IL-12 secretada por célula está por encima de un nivel umbral; y
- la introducción de un número eficaz de las células secretoras de IL-12 generadas en el sujeto.

En otra realización, la descripción proporciona un método para mantener los niveles de IFN gamma inducidos por IL-12 en un anfitrión que comprende:

- la generación de una célula secretora de IL-12 en donde la IL-12 secretada por célula está por encima de un nivel umbral; y
- la introducción de un número eficaz de las células secretoras de IL-12 generadas en el sujeto.

En una realización, se administran a un sujeto las células transducidas, una población de células y/o una composición que comprende dichas células. En otra realización, las células, la población de células y/o la composición se administran con un coadyuvante. Por ejemplo, en una realización se utiliza adyuvante incompleto de Freund. Además, las células, la población de células y/o composición se administran una vez, o repetidamente. Por ejemplo, las células y/o la población de células se administran una segunda vez para estimular la respuesta inmunitaria y/o aumentar la cantidad de IL-12 suministrada o de IFNgamma sostenida.

En una realización, las células cancerosas se obtienen de un sujeto, y se modifican genéticamente para expresar y/o secretar IL-12 por encima de un nivel umbral. Las células transducidas o la población de células que comprende células transducidas se irradian y se administran al sujeto. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el uso clínico de las células modificadas se limita al sujeto del que se obtuvo la célula cancerosa.

Cuando las células expresan adicionalmente un polinucleótido activador que codifica un polipéptido que convierte un profármaco en un fármaco, por ejemplo un polinucleótido tmpk modificado, opcionalmente las células no se irradiados. Cualquier célula no deseada puede ser destruida tras la administración del profármaco. Por ejemplo, en algunos casos, la irradiación puede afectar negativamente a la capacidad de las células transducidas para inducir una respuesta inmunitaria p.ej. la irradiación puede causar la muerte celular en ciertas poblaciones de células. El uso de un polinucleótido activador u otro mecanismo para eliminar las células no deseadas trasplantadas al sujeto se emplea alternativamente en tales situaciones.

Los métodos descritos en la presente memoria son útiles para el tratamiento de una variedad de cánceres. Los autores de la presente invención han demostrado que las leucemias de una variedad de tipos son susceptibles de tratamiento con IL-12.

La enfermedad residual que puede permanecer latente durante las remisiones puede ser elegida como diana por el método descrito en la presente memoria. La progresión tardía de la enfermedad de muchas leucemias ofrece una ventana de oportunidad crítica para los enfoques basados en la inmunidad. La presente inmunoterapia también puede deshacerse de células quiescentes, tales como cáncer "madre" que inician un cáncer, ya que no requiere dianas bioquímicamente o genéticamente activas. Además, la presente inmunoterapia también puede conducir a la erradicación de la enfermedad metastásica.

Los métodos descritos en la presente memoria también son útiles para el tratamiento de cánceres sólidos. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar para el tratamiento del melanoma, el cáncer renal y el cáncer de próstata.

5 Las células se pueden introducir por una variedad de rutas, como se describe en otros lugares incluyendo la inyección intraperitoneal o la infusión intravenosa. Alternativamente, se pueden inyectar una construcción de vector, un virus aislado o una composición que comprende dicha construcción o virus por vía intratumoral de manera que la transducción se lleva a cabo in vivo.

10 En una realización, el número de células inyectadas o administradas es un número eficaz para inducir una respuesta inmunitaria. Una respuesta inmunitaria se puede detectar utilizando una serie de métodos conocidos en la técnica, incluyendo la detección del reconocimiento de las células T del anfitrión de las células tumorales in vitro. Alternativamente, se puede detectar una respuesta inmunitaria mediante la evaluación de los cambios del perfil de citoquinas. Por ejemplo el aumento de expresión de IFN-gamma es indicativo de una respuesta inmunitaria.

15 En ciertas realizaciones, los métodos comprenden adicionalmente el seguimiento de la progresión del cáncer. La progresión del cáncer se puede controlar utilizando métodos conocidos.

20 En una realización, las composiciones y los vectores de la presente descripción se utilizan para el tratamiento del cáncer mediante la terapia adoptiva. En una realización, las células linfocíticas citotóxicas se expanden utilizando células transducidas con LV-IL-12 in vitro. La terapia adoptiva o la (inmuno)terapia adoptiva se refieren a la transferencia pasiva de células reactivas del tumor inmunológicamente competentes al anfitrión que porta el tumor para mediar, directa o indirectamente, en la regresión del tumor. La viabilidad de la (inmuno)terapia adoptiva del cáncer se basa en dos observaciones fundamentales. La primera de estas observaciones es que las células tumorales expresan antígenos únicos que pueden provocar una respuesta inmunitaria dentro del anfitrión singénico (genéticamente idéntico o similar especialmente con respecto a antígenos o reacciones inmunológicas). La otra es que el rechazo inmunitario de los tumores establecidos puede estar mediado por la transferencia adoptiva de células linfoides adecuadamente sensibilizadas. Las aplicaciones clínicas incluyen la transferencia de células madre de sangre periférica después de la quimioterapia no mieloablativa con o sin radiación en pacientes con linfomas, leucemias y tumores sólidos.

30 En un aspecto de la presente descripción, las células T del donante o las células madre (ya sea embrionarias o de una ontogenia posterior) son transducidas con vectores de la descripción. Las células que expresan estos vectores son aisladas y transferidas adoptivamente a un anfitrión que necesita tratamiento. En una realización, la médula ósea del receptor ha experimentado un agotamiento de células T. Los métodos de transferencia adoptiva de células T son conocidos en la técnica (J Translational Medicine, 2005 3(17): doi:0.1186/1479-5876-3-17, Adoptive T cell therapy: Addressing challenges in cancer immunotherapy. Cassian Yee). Este método se utiliza para el tratamiento de tumores sólidos y no requiere el direccionamiento de las células T que expresan el vector de transducción hacia el tumor ya que las células T modificadas reconocerán las diferentes moléculas de la clase del MHC presentes en el anfitrión receptor dando como resultado la destrucción citotóxica de las células tumorales.

40 En una realización, las DC autólogo y las células T se ponen en contacto ex vivo con células cancerosas transducidas con IL-12 y/o expandidas ex vivo y se administran a un sujeto que lo necesite con o sin células secretoras de LV-IL-12.

45 Las composiciones y vectores también son útiles para la reducción de la proliferación celular, por ejemplo para el tratamiento del cáncer. La presente descripción también proporciona métodos para utilizar composiciones y vectores de la descripción para la expresión de IL-12 para la reducción de la proliferación celular, por ejemplo para el tratamiento del cáncer.

50 La descripción también proporciona un método para reducir el número de células tumorales o la carga de cáncer en un sujeto con cáncer, o que tiene una mayor probabilidad de desarrollar cáncer que comprende la administración de una célula transducida, una población de células, o una composición que comprende dichas células al sujeto.

55 En otra realización, la descripción proporciona un método de tratamiento de un sujeto con cáncer o con un mayor riesgo de desarrollar cáncer que comprende la administración de una célula transducida, una población de células, o una composición que comprende dichas células al sujeto.

60 Las construcciones de vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico de la descripción y los virus aislados se administran típicamente a mamíferos, preferiblemente seres humanos, utilizando técnicas descritas a continuación. Los polipéptidos producidos a partir de las moléculas de ácido nucleico también se administran opcionalmente a mamíferos, preferiblemente seres humanos. La presente descripción se refiere a un método de tratamiento médico de un mamífero que lo necesita, preferiblemente seres humanos, mediante la administración al mamífero de una construcción de vector descrita en la presente memoria o una célula que contiene la construcción de vector.

Un aspecto se refiere a métodos para proporcionar una molécula de ácido nucleico codificante a las células de un individuo de tal manera que la expresión de la molécula de ácido nucleico codificante en las células proporciona la actividad biológica o el fenotipo del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico codificante. El método también se refiere a un método para proporcionar a un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o estado físico anómalo un polipéptido biológicamente activo mediante la administración de una molécula de ácido nucleico de la presente descripción. El método se puede realizar *ex vivo* o *in vivo*. Los métodos y las composiciones para la terapia génica se muestran, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núm. 5.869.040, 5.639.642, 5.928.214, 5.911.983, 5.830.880, 5.910.488, 5.854.019, 5.672.344, 5.645.829, 5.741.486, 5.656.465, 5.547.932, 5.529.774, 5.436.146, 5.399.346 y 5.670.488, 5.240.846. La cantidad de polipéptido variará con las necesidades del sujeto. La dosificación óptima del vector puede ser fácilmente determinada utilizando técnicas empíricas, por ejemplo por el aumento a escala de la dosis (véase el documento US 5.910.488 para un ejemplo de aumento a escala de la dosis).

El método también se refiere a un método para producir una provisión de partida de virus recombinante mediante la producción de virus adecuado para la terapia génica que comprende el ADN modificado que codifica un gen de interés. Este método implica preferiblemente la transfección de células permisivas para la replicación del virus (conteniendo el virus el gen terapéutico) y la recolección del virus producido.

Se puede emplear la co-transfección (ADN y marcador en moléculas separadas) (véase, p.ej. el documento US 5.928.914 y el documento US 5.817.492). Además, se puede utilizar un casete de detección o marcador (tal como marcador de Proteína Fluorescente Verde o un derivado) dentro del propio vector (preferiblemente un vector viral).

Tratamientos combinados

En ciertas realizaciones, las construcciones de vectores, las células transducidas, la población de células y/o composiciones que las comprenden, se administran combinados con otras terapias. Por ejemplo, las construcciones de vectores, las células transducidas, la población de células y/o las composiciones que las comprenden se pueden administrar antes o después de la quimioterapia adecuada para el cáncer que está siendo tratado. En otras realizaciones en donde el cáncer es un cáncer sólido, las construcciones de vectores, las células transducidas, la población de células y/o las composiciones que las comprenden se administran antes o después de la cirugía.

En una realización, las células cancerosas se cosechan a partir de sangre de un sujeto antes de que el tratamiento combinado, opcionalmente quimioterapia, se haya iniciado. Las células cancerosas son transducidas a continuación con un LV- IL-12. Las células transducidas se congelan para su uso posterior y se administran cuando el sujeto está en remisión.

Dosificación

En ciertas realizaciones, los métodos proporcionan que una composición, una célula transducida, una población de células, o una construcción de vector descritas en la presente memoria sean administradas al sujeto. Las composiciones, células o construcciones de vectores de la presente solicitud se pueden administrar al menos una vez a la semana en una realización. Sin embargo, en otra realización, la composición, la célula transducida, la población de células, o la construcción de vector se pueden administrar al sujeto desde aproximadamente una vez por semana, una vez cada 14 días, o 28 días. La administración se puede repetir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más veces. En otra realización, la administración es de aproximadamente una vez al día para un tratamiento dado, por ejemplo para la terapia con rIL-12. La longitud del período de tratamiento depende de una variedad de factores, tales como la gravedad de la enfermedad, la edad del paciente, la concentración y la actividad de los compuestos de la presente solicitud, o de una combinación de los mismos. En una realización, el tratamiento es un tratamiento crónico y la duración del tratamiento es de 1-2 semanas, 2-4 semanas o más de 4 semanas. El régimen de tratamiento puede incluir programas de tratamiento repetidos. Se apreciará también que la cantidad eficaz o dosificación del compuesto utilizado para el tratamiento o la profilaxis pueden aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento o régimen de profilaxis particular. Los cambios en la dosificación pueden resultar y ser evidentes por medio de análisis de diagnóstico convencionales conocidos en la técnica. En algunos casos, puede ser necesaria la administración crónica.

El número de células administradas varía con el nivel de expresión de la célula transducida o de la población de células. Por ejemplo, cuando las células que expresan IL-12 expresan más de 20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12, pueden ser suficientes tan pocos como 5.000 o 0,5% de una población de células que comprenden células que expresan IL-12 para los métodos descritos en la presente memoria. Sin embargo, cuando las células que expresan IL-12 expresan solamente 2.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12, puede ser necesaria más de 100.000 o 10% de una población de células que comprenden células que expresan IL-12.

En una realización, se administran 1-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 o más de 100 x 10⁶ células. En otra realización, se administran 10⁶ - 10⁹ células. Cuando las células producen más que 2.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, más de 10% de la población de células expresa IL-12. Cuando las células expresan

20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, al menos 0,5% de la población de células expresa IL-12.

Producción de polipéptido y herramientas de investigación

5 Una línea celular (ya sea un cultivo de células inmortalizadas o un cultivo de células madre) transfectada o transducida con un polinucleótido de la descripción (o variantes) es útil como herramienta de investigación para medir los niveles de expresión de la molécula de ácido nucleico codificante y la actividad de la polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico codificante.

10 La presente descripción incluye un método para producir una célula anfitriona recombinante capaz de expresar una molécula de ácido nucleico de la presente descripción que comprende la introducción en la célula anfitriona de un vector de la presente descripción.

15 La descripción también incluye un método para expresar un polipéptido en una célula anfitriona de la descripción que incluye cultivar la célula anfitriona en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula de ácido nucleico codificante. El método proporciona típicamente el fenotipo del polipéptido a la célula.

20 Se describe un polipéptido aislado producido a partir de una molécula de ácido nucleico o vector de la invención de acuerdo con un método de la descripción.

También se describe un sistema o modelo para someter a ensayo el mecanismo de rechazo del cáncer mediado por IL-12. En una realización el sistema es un sistema *in vitro*. La comprensión del mecanismo subyacente que conduce a una respuesta inmunitaria anti-leucemia eficaz se facilita en gran medida mediante el establecimiento de análisis *in vitro* que imitan las observaciones *in vivo*. Esto es útil para comparar y adaptar los modelos murinos a enfermedades humanas. En una realización, el sistema *in vitro* comprende DC murinas derivadas de médula ósea (cultivadas durante 6-9 días en GM-CSF) inducidas a madurar (aumento de la expresión de CD80) en presencia tanto de células de bazo + células productoras de 70Z/3-IL-12 (pero no cualquiera sola). La maduración no se produce si se sustituyen las células 70Z/3 no transducidas por las células 70Z/3-IL-12. Las poblaciones seleccionadas del bazo se añaden las células y/o retiran (células T inmaduras, células T CD4⁺, células T CD8⁺, células NKT, células NK, precursores de DC) para definir los tipos de células críticas que se requieren para la maduración de DC mediada por 70Z/3 - IL-12.

35 En una realización el sistema comprende células de leucemia humanas que expresan IL-12 y/o un modelo de ratón susceptible de desarrollar cáncer para determinar el mecanismo por el que la interleuquina-12 (IL-12) provoca una respuesta inmunitaria que, en ratones, da como resultado un rechazo completo de la leucemia. En una realización, el sistema permite el análisis de las interacciones de células T, células dendríticas (DC), células de leucemia y las citoquinas que producen en sistemas murinos establecidos *in vitro* e *in vivo*. En otra realización, el sistema permite la optimización de los parámetros esenciales para la modificación genética de muestras primarias de células de leucemia humana para expresar cantidades de IL-12 por encima de umbrales necesarios establecidos en el sistema murino. En una realización adicional, el sistema es útil para establecer condiciones *in vitro* para determinar cómo las células primarias de leucemia humana que expresan IL-12 interactúan con las DC autólogas y las células T.

Ejemplos

Ejemplo 1

La inyección directa de IL-12 recombinante ha demostrado eficacia en algunos modelos de ratón de leucemia [9-13] mientras que las pruebas iniciales en seres humanos que emplean este enfoque fueron menos prometedoras ([14-17] y comentadas en [4]). Es bien reconocido en la bibliografía que la actividad anti-leucemia inducida por IL-12 está mediada en gran medida por la secreción secundaria de IFN- γ [13]. Gollob *et al.*, en particular, han sugerido que la inducción y mantenimiento de IFN- γ inducido por IL-12 fue un componente clave de la terapia eficaz en pacientes con cáncer de células renales metastásico [18]. Sin embargo, la inducción concomitante de efectos antagónicos con niveles de IFN- γ elevados sigue planteando un desafío y es el impulso para diversos grupos para seguir sometiendo a ensayo la eficacia de IL-12 recombinante siguiendo diferentes protocolos de dosificación y temporales [7, 8, 19- 21] y para evaluar el potencial terapéutico de terapia génica con IL-12 basada en células ([22-27] y comentada en [4, 13]) con el fin de superar esto.

60 Las pruebas clínicas más recientes han incluido enfoques tales como inyección intraleucémica de fibroblastos y células dendríticas que secretan IL-12, los métodos que han demostrado ser eficaces en modelos de ratón. Hasta la fecha, estos enfoques no han tenido un impacto significativo sobre la supervivencia de los pacientes [15-17]. Encontrar la razón de esta falta de conexión es de suma importancia.

Los autores de la presente invención publicaron recientemente un modelo de LLA en la que una variante de la línea 70Z/3 de leucemia de células pre-B murina, 70Z3-L, es letal en ratones singénicos, mientras que otra variante,

70Z/3-NL, provoca una respuesta inmunitaria protectora (27). Las células 70Z/3-L, aunque incapaces de iniciar inmunidad, fueron rechazadas fácilmente cuando se inició primero una respuesta inmunitaria contra células 70Z/3-NL. Por lo tanto, el modelo de los autores de la presente invención es susceptible de comprobar si IL-12 puede iniciar una respuesta inmunitaria específica, el reconocimiento de 70Z/3-L y la supervivencia de los animales sensibilizados. La leucemia 70Z/3 es una reminiscencia de la LLA humana con lesiones neoplásicas que surge en el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, médula ósea y rara vez el sistema nervioso central. Entre las manifestaciones físicas más comunes de la enfermedad se encuentran la ascitis y esplenomegalia.

Materiales y métodos

Animales.

Los ratones hembra (C57Bl/6xDBA/2) F1 (denominados BDF₁), 8-12 semanas de edad, fueron adquiridos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Ma). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones estériles en la instalación para animales libre patógeno específica (SPF) en el Instituto del Cáncer de Ontario, Princess Margaret Hospital, Toronto, Ontario, Canadá. A los ratones se les alimenta con una dieta irradiada y agua del grifo sometida a autoclave. Se acabó con los animales mediante asfixia con CO₂ y dislocación cervical. El Comité de Cuidado de Animales del Instituto de Cáncer de Ontario aprobó todos los protocolos experimentales empleados.

Células tumorales.

Células de leucemia.

Las células de leucemia 70Z/3-L (descritas en [28]), derivadas de ratones BDF₁, se mantuvieron en IMDM con suero bovino fetal inactivado por calor al 5% (Hyclone, South Logan, UT, EE.UU.), 100 µg/ml de penicilina-estreptomicina o 100 µg/ml de kanamicina (GIBCO-Invitrogen), y β-mercaptoetanol 5,5x10⁻⁵ M (denominado IMDM completo) en una atmósfera humidificada a 37°C y 5 CO₂ al 5%. Las concentraciones de células se mantuvieron a 5-10x10⁶ células/mL.

Construcción del vector lentiviral.

Los vectores lentivirales que expresan IL-12 de ADNc se construyeron mediante un método similar al descrito por Yoshimitsu et al. [29] con modificaciones. El plásmido pORF-mIL12 (IL-12elasti(p35::p40) Mouse (p35::p40)) (InvivoGen, San Diego, CA) se modificó mediante la creación de sitios para enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, aguas arriba y aguas abajo del gen de IL-12, respectivamente, utilizando un QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). A continuación, esta construcción resultante se digirió con *EcoRI/BamHI* (New England Biolabs). El ADNc de IL-12 murino se purificó después de electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y a continuación se subclonó en la cadena principal de LV de pHR' aguas abajo del promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1α). Los clones plasmídicos positivos para pHR-cPPT-EF1α-muIL-12-WPRE (es decir LV-muIL-12) se identificaron mediante análisis de digestión con enzimas de restricción de diagnóstico y posterior secuenciación de ADN (InnobioTech, Toronto, ON, Canadá).

Producción viral y transducción de las células.

Los LV concentrados se produjeron mediante un método de triple transfección transitoria utilizando pHR-cPPT-EF1α-muIL-12-WPRE y plásmidos de accesorios sobre monocapas 293T mediante fosfato de calcio [30, 31]. Un título de vector aproximado se estimó basándose en la producción de LV/enGFP [29] y el ensayo en células 293T no sometidas a tratamiento previo que se produjeron en paralelo. La línea de células leucémicas pre-B murina, 70Z3-L, fue transducida a continuación con una multiplicidad de infección (MOI) aproximada de 20. Los clones de células individuales, obtenidos por dilución limitante en placas de 96 pocillos a densidades de población de menos de 0,3 células/pocillo se cuantificaron a continuación para determinar la producción de IL-12/10⁶ células/mL/2 horas utilizando de un kit ELISA para IL-12 disponible comercialmente (BD Biosciences, San Jose, CA).

Experimentos de sensibilización in vivo.

Experimentos de sensibilización in vivo.

Las células de leucemia y las células transducidas se cultivaron en IMDM completo y se lavaron 3 veces con 30 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con Ca²⁺ y Mg²⁺. Las células se volvieron a suspender a 5-10x10⁶ células/mL en PBS y se inyectaron a los animales a un volumen de 100-200 µL. Los ratones recibieron inyecciones IP que se realizaron en el lado derecho del abdomen utilizando una jeringa de 1 mL con una aguja de calibre 26.

Recogida de suero.

La recogida de suero en ratones vivos se logró mediante la punción de la vena safena con una aguja estéril y

recogiendo la sangre en un tubo separador de suero (BD, NJ, EE.UU.). Estos tubos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos, el suero se transfirió a continuación a un tubo de microcentrífuga y se congeló a -20°C hasta su uso.

5 **Administración intraperitoneal de rIL-12.**

La IL-12 recombinante de ratón fue adquirida de R&D Systems, Minneapolis, EE.UU. A los ratones se les inyectaron IP 10 células 70Z/3-L en 100-200 µL de PBS en el día 0, seguido de inyecciones diarias de 0,1-20 ng/ratón/día de rIL-12 en PBS durante un periodo de 14 días. Una sensibilización secundaria consistió en la inyección IP de 10⁶ células 70Z/3-L 70 días después de la sensibilización primaria, llevada a cabo en la forma que se acaba de describir. Para los tratamientos con rIL-12 retardados los ratones recibieron una inyección IP de 10 células 70Z/3-L en 100-200 µL de PBS el día 0. Después de eso los grupos de 4 o 5 ratones recibieron 14 inyecciones IP sucesivas de rIL-12 de 20 ng/ratón/día pero el comienzo de estas inyecciones se retrasó entre 0 y 5 días. Los animales se controlaron diariamente para determinar la aparición de los síntomas tanto durante el período de inyección como tras el final de las inyecciones.

Administración intraperitoneal de IL-12 producida por células de leucemia.

Se produjeron células secretoras de interleuquina-12 como se ha descrito anteriormente. A los ratones se les inyectaron IP 10⁶ células transducidas o una mezcla de las células transducidas y no sometidas a tratamiento previo en diversas proporciones en 100-200 µL de PBS. Un desafío secundario consistió en la inyección IP de 10⁶ células 70Z/3-L o 10⁶ células L1210 más de 110 días después de la sensibilización primaria llevada a cabo de la manera recién descrita. Los animales se controlaron diariamente para determinar la aparición de los síntomas después de la inyección.

25 **Sensibilización en animales que experimentan agotamiento.**

Los ratones experimentan un agotamiento de células CD4⁺, CD8⁺ o ambos subconjuntos de células T así como de células NK e IFN-γ utilizando anticuerpos específicos. El hibridoma GK1.5 se dirige contra células T CD4⁺, YTS169 contra células T CD8⁺, HB170 (R4-6A2) contra IFN-γ y el hibridoma HB9419 se utilizó para producir un anticuerpo de control de isotipo. Todos los hibridomas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, EE.UU.). Las líneas se cultivaron en 2,5 litros de IMDM completo u OptiMEM en bolsas de cultivo Lifecell (Lifecell Tissue Culture, Baxter Corporation, Concord, Ontario, Canadá) en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% de CO₂ hasta que un recuento de células vivas (con exclusión de azul de tripano) reveló 30% de células muertas en el cultivo. A continuación, el medio se centrifugó y se filtró para eliminar las células y restos celulares. Los anticuerpos se purificaron a partir del medio utilizando una columna de afinidad de esferas de sefarosa empaquetadas (GammaBind G, Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, EE.UU.) y se concentraron con columnas Centriprep YM-30 (Millipore, Billerica, Massachusetts, EE.UU.) antes de la diálisis en PBS. Las células NK se agotaron utilizando un anticuerpo anti-asialoGM1 producido por Wako Bioproducts (Richmond, VA). La IgG de conejo (Sigma-Aldrich) se utilizó como control para el anticuerpo anti-asialoGM1. El subconjunto de células T y los anticuerpos IFN-gamma se inyectaron los días -1, 3, 7, 10 y 14. Las dosis utilizadas fueron 1 mg de anticuerpo el día -1 y 500 µg para las inyecciones restantes. El anticuerpo para el agotamiento de la célula NK se inyectó los días -1, 4, 9 y 14 utilizando la dilución recomendada [32]. Los anticuerpos de control de isotipo se inyectaron siguiendo la misma dosis y programa que sus correspondientes anticuerpos de agotamiento. El potencial de agotamiento de los anticuerpos se demostró *in vivo* antes de su uso en los experimentos de los autores de la presente invención mediante la inyección a ratones de un intervalo de concentraciones y, posteriormente, mediante el examen de los tejidos por citometría de flujo para cuantificar los subgrupos celulares, o el examen del suero para determinar la presencia de citoquinas mediante ELISA. Este experimento se realizó dos veces para someter a ensayo ambos sistemas modelo. En cada caso, las células se inyectaron el día 0: o bien 10⁶ células 70Z/3-L seguido de 14 inyecciones diarias de rIL-12 (10 o 20 ng/ratón/día) o bien 10⁶ células transducidas con el vector 70Z/3-L de la línea clonal LV12.2. Los controles incluyeron ratones a los que se habían inyectado 70Z/3-L solas y ratones a los que se había inyectado PBS solo de acuerdo con el programa de inyecciones apropiado.

55 **Análisis con esferas para determinar los niveles de citoquinas en el suero.**

A los ratones se les inyectaron IP el día 0 10 células 70Z/3-L en 100 µL de PBS y se trataron diariamente con preparaciones de 100 µL de PBS solo o que contenía dosis bajas de rIL-12 (10 o 20 ng/ratón/día) durante 14 días. Los grupos de control incluían ratones que recibieron inyecciones diarias durante 14 días de PBS en ausencia de células 70Z/3-L y rIL-12, y un grupo que se dejó enteramente sin tratar. Alternativamente, para el experimento de terapia con IL-12 mediada por células de leucemia, a los ratones se les inyectaron el día 0 10⁶ células 70Z/3-L en 100 µL de PBS que contenía diversas proporciones de la línea celular LV12.2 transducida con el vector 70Z/3-L (0,5%, 1% y 10%). Los grupos control incluían ratones a los que se habían inyectado células 70Z/3-L solas o PBS solo. Se recogió el suero no-terminal de todos los grupos los días 7, 10 y 20 antes de su inyección diaria mediante punción de la vena safena como se describió anteriormente. Todos los ratones del grupo que recibió las células

70Z/3-L solas en el modelo de terapia con IL-12 producida por células de leucemia habían perecido el día 20, de manera que el suero no se recogió de este grupo. Las muestras de suero se diluyeron 1/5 y se tiñeron de acuerdo con el protocolo proporcionado con el Inflammation Cytometric Bead Array Kit (BD, San Diego, CA, EE.UU.). Se prepararon patrones por triplicado a partir de diluciones independientes y la citometría de flujo se realizó utilizando un FACScan (Becton Dickinson, Oakville, ON). La adquisición se realizó utilizando el soporte lógico CellQuest versión 3.1.

Transferencia Southern para determinar el número de copias del gen.

El número de copias del gen mull-12 de clones 70Z3-L transducidos con el vector se determinó mediante transferencia Southern como se ha descrito antes²⁴. Brevemente, 5 µg de ADN genómico extraído de las células 70Z3-L transducidas con el vector de control o no sometidas a tratamiento previo se trataron con EcoRI y con HindIII (New England Biolabs) y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. A continuación, el gel de agarosa se lavó y se transfirió a una membrana de nailon cargada positivamente (Bio-Rad)²⁵. Un fragmento de 746 pb que contenía la secuencia WPRE de LV-mulL-12 que se debía utilizar como la sonda de hibridación se amplificó mediante PCR (Cebador directo; 5'-tgctccttttacgctatgtgg-3', Cebador inverso; 5'-tcgttgggagtggaattagcc-3') empleando el kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche). La hibridación de Southern se realizó utilizando el kit DIG Luminescent Detection (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las diluciones seriadas del plásmido LV-mulL-12 (véase más arriba) en el ADN genómico de ratón se utilizaron como patrones de WPRE. Los resultados se analizaron mediante el soporte lógico de obtención de imágenes NIH y se presentaron como copias/genoma.

RESULTADOS

La administración intraperitoneal de rIL-12 protege a los ratones sensibilizados con 70Z/3-L.

La interleuquina-12 es conocida por ser un potente modulador de la respuesta inmunitaria atribuida a una serie de efectos anti-leucemia, incluyendo, pero sin limitarse a, la eliminación de la leucemia específica de antígenos mediada por células T. Esta molécula ha sido aprobada para uso clínico, pero los programas de suministro óptimos aún no se han definido. En un intento de alterar el curso de la leucemia 70Z/3-L, los autores de la presente invención empezaron sometiendo a ensayo el efecto de la administración IP de rIL-12 en presencia morbilidad después de la inyección IP de 10⁶ células 70Z/3-L. Se sometieron a ensayo dosis de 0,1-20 ng/ratón/día durante 14 días, que son al menos 20 veces inferiores a la dosis máxima tolerada en ratones. En la Figura 1a, los autores de la presente invención muestran que dosis superiores a 10 ng eran suficientes para mejorar significativamente la supervivencia de los animales (p = 0,002).

La administración intraperitoneal de rIL-12 conduce a inmunidad protectora a largo plazo contra la leucemia 70Z/3-L.

Los siguiente en abordar es si los resultados observados anteriormente eran debidos únicamente a los efectos agudos de rIL-12 administrada IP sobre las respuestas innatas o para la inducción de una respuesta inmunitaria adaptativa a largo plazo en los ratones. Para lograr esto, los ratones recibieron inyecciones ip de 10⁶ células 70Z/3-L, se trataron durante 14 días con 20 ng/ratón/día de rIL-12, posteriormente se sensibilizaron 70 días más tarde con una inyección IP de 10⁶ células 70Z/3-L y se controlaron para determinar la aparición de los síntomas. Se incluyó un grupo de ratones no sometidos a tratamiento previo para el control de la eficacia de las células para causar la enfermedad. La Figura 1 bii muestra que todos los animales tratados en primer lugar con la administración IP de rIL-12 (Figura 1bi) sobrevivieron a una sensibilización secundaria con células 70Z/3-L en ausencia de terapia adicional con IL-12. Así, la administración IP de rIL-12 no sólo protegió contra la sensibilización primaria con 70Z/3-L, sino también estableció memoria inmunitaria protectora a largo plazo.

La administración intraperitoneal de rIL-12 protege a los animales con leucemia 70Z/3-L preestablecida.

Para determinar si la administración IP de rIL-12 puede dar lugar a la eliminación de la leucemia, así como a la protección contra el desarrollo de una neoplasia, se retrasó el comienzo del tratamiento para permitir la diseminación de la enfermedad. Estos 4 experimentos se llevaron a cabo a partir de 10⁶ células 70Z/3-L inyectadas IP debido a su rápido crecimiento. Esta dosis es aún letal para 100% de los ratones en el plazo de aproximadamente 20 días. El comienzo de la administración de rIL-12 se retrasó de 0 a 5 días y continuó durante 14 días después de la primera inyección. Los autores de la presente invención han encontrado que el inicio de la terapia con rIL-12 podría retrasarse 5 días y aún así lograr una protección significativa contra la leucemia (Figura 1c). Las diferencias entre las curvas de supervivencia de los seis grupos de tratamiento no son estadísticamente significativas y no se sometieron a ensayo retrasos más largos.

Las células T CD4⁺ y CD8⁺ son requeridas para el rechazo mediado por rIL-12 de células 70Z/3-L después de la administración IP.

Se utilizaron anticuerpos de agotamiento para determinar qué tipos celulares median el rechazo inducido por rIL-12

de la leucemia 70Z/3-L después de la administración IP. La Figura 1d muestra que las células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ son importantes puesto que el agotamiento de cualquier población elimina la protección inmunológica en todos los animales. La supervivencia media fue de 14 días para los ratones con agotamiento de células T CD8⁺, 23 días para los ratones con agotamiento de células T CD4⁺ y 13 días para los ratones con agotamiento de ambos subconjuntos de células T. Las tres curvas no son estadísticamente diferentes entre sí. Se incluyeron anticuerpos neutralizadores contra el IFN- γ para examinar su papel en la respuesta de rechazo. Este anuló los efectos protectores de rIL-12 administrada IP, demostrando que el IFN- γ juega un papel esencial en el rechazo de la leucemia. Aunque se ha demostrado la importancia de las células NK en otros modelos de terapia con IL-12 [33, 34] no se observaron cambios en el rechazo de la leucemia 70Z/3-L cuando tuvo lugar un agotamiento de células NK en esta modalidad de tratamiento (Figura 1d).

Generación de células de leucemia que secretan IL-12 mediante la aplicación de la transducción lentiviral.

A la luz de estos resultados, se exploró la opción de desarrollar un enfoque mediado por células de leucemia para el suministro de tratamiento con IL-12. La Figura 2a muestra la construcción lentiviral con un transgén de fusión de IL-12 bajo el control del promotor EF-1 α que fue generado. Después de la transducción de las células 70Z/3-L con una MOI aproximada de 20, los clones de células individuales se obtuvieron como se describe en Materiales y Métodos. Los sobrenadantes de estas líneas celulares clonales se sometieron a ensayo para determinar la producción de IL-12. El intervalo de secreción a partir de clones seleccionados variaba de aproximadamente 250 a 91.000 pg/mL/10⁶ células/2hrs y estos niveles se mantuvieron estables a lo largo del tiempo como se muestra en la Figura 2b. Además, los diferentes niveles de IL-12 medidos no parecían dependientes de la cinética de crecimiento celular, ni de la supervivencia, ya que las propiedades de crecimiento *in vitro* de los clones transducidos por el vector fueron similares tal como se mide por la incorporación de timidina y la inspección visual. El análisis de Transferencia Southern demostró que ningún clon tenía más de 7 eventos de integración proviral.

Sólo se requiere una pequeña proporción de células 70Z/3-L transducidas con el vector productoras de IL-12 para conferir inmunidad.

El que la producción de IL-12 por células 70Z/3-L transducidas por el vector provocara una respuesta inmunitaria protectora se determinó mediante la inyección de 10⁶ células de cada uno de 12 clones, que abarca un amplio intervalo de niveles de secreción, a la cavidad abdominal de ratones BDF₁. Los tres clones de menor producción (intervalo: 200-1.000 pg/mL/10⁶ células/2hrs) fracasaron para provocar una respuesta inmunitaria y de los ratones a los que se habían inyectado estas células progresaron hacia la muerte. En contraste, todos los ratones a los que se habían inyectado 10⁶ células de los diez clones de mayor producción (intervalo: de 1500 - 40000 pg/mL/10⁶ células/2hrs) sobrevivieron (Figura 3). Hasta la fecha, la mayoría de los ratones incluidos en este estudio han sobrevivido más allá de 2 años después de la inyección.

Un clon transducido con 70Z/3-L, LV12.1 que produce aproximadamente 21.500 pg/mL/10⁶ células/2 horas, se mezcló con las células 70Z/3-L no sometidas a tratamiento previo para determinar si la inclusión de células transducidas con el vector que producían IL-12 daría como resultado también la eliminación de las células no productoras. Tan poco como 2% de las células transducidas con el vector fue suficiente para conferir una protección completa (Figura 4a). Para examinar adicionalmente la eficacia de proporciones productoras/no productoras, se seleccionaron otros dos clones transducidos con 70Z/3-L que diferían en la producción de IL-12 en 10 veces (clon LV12.3: 2.000 pg/mL/10⁶ células/2 horas vs. clon LV12.2: 20.000 pg/mL/10⁶ células/2 horas). En este caso, tan poco como 0,5% (es decir, 5.000 células LV12.2 en 10⁶ células totales) del clon de más alta producción era suficiente para conferir protección al 80% de los ratones, pero 0,1% no protegió a ningún ratón. Sin embargo, incluso 10% (es decir, 100.000 células LV12.3 en 10⁶ células totales) del clon de menor producción fue insuficiente para proteger, lo que indica que se requiere un umbral de producción de IL-12 por célula transducida con el vector para provocar una respuesta inmunitaria eficaz (Figura 4b).

La terapia con IL-12 mediada por células de la leucemia conduce a la inmunidad protectora específica a largo plazo contra la leucemia 70Z/3-L.

Más de 110 días después de la inyección IP con 10⁶ células LV12.2, los ratones se sensibilizaron con 10⁶ células de la línea parental de leucemia 70Z/3-L o de otra leucemia de células B bien caracterizada, L1210, y controlaron para determinar la aparición de los síntomas. Se incluyeron grupos de ratones no tratados previamente para el control de la eficacia de las células tanto 70Z/3 como L1210 para causar la enfermedad. La Figura 5 muestra que todos los animales que sobreviven al ataque inicial con LV12.2 eran inmunes a la sensibilización subsiguiente con 70Z/3-L, pero no con L1210. Por lo tanto, la terapia con IL-12 mediada por células conduce a inmunidad protectora específica a largo plazo.

Se requieren principalmente células T CD4⁺ para el rechazo mediado por células de leucemia de células 70Z/3-L.

Se utilizaron anticuerpos de agotamiento para determinar qué tipos celulares median el rechazo inducido por IL-12

de la leucemia 70Z/3. La Figura 6 muestra que el subconjunto de células T CD4⁺ tiene importancia primordial a diferencia del modelo terapia con rIL-12 administrado IP anteriormente. La supervivencia media de los ratones sensibilizados con leucemia fue de 37 días para los animales con agotamiento de células T CD4⁺ y de 18 días para aquellos con agotamiento de ambos subconjuntos de células T. Las curvas son estadísticamente diferentes ($p = 0,003$), lo que sugiere un papel importante para las células T CD8⁺, pero sólo en ausencia de células T CD4⁺. El subconjunto de células T CD8⁺ por sí solo no es suficiente para conferir protección. Además, la neutralización de IFN- γ no disminuyó el efecto protector como se ha visto con la terapia con rIL-12 administrada IP (Figura 6). Este fue un resultado sorprendente y llevó a los autores de la presente invención a preguntarse adicionalmente sobre la regulación de IFN- γ y varias otras citoquinas inflamatorias en cada modelo.

Regulación de citoquinas *in vivo*.

La interleuquina-12 induce la secreción de otras citoquinas que pueden tener efectos agonísticos, antagónicos o sinérgicos y pueden influir en la respuesta inmunitaria específica que se inicia [6-8, 18, 35-38]. Por consiguiente, era importante para medir la regulación de algunas de estas citoquinas *in vivo* para comprender mejor cómo se lleva a cabo el rechazo de la leucemia y arrojar alguna luz sobre los resultados de los experimentos de neutralización de los autores de la presente invención. Para este fin se empleó una técnica citometría de flujo que detecta un panel de citoquinas inflamatorias, incluyendo IL-12 p70, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6 en el suero. Los ratones recibieron inyección IP de 10^6 células 70Z3-L el día 0 e inyecciones IP diarias de 10 o 20 ng de rIL-12/ratón/día durante 14 días. Las muestras de suero se recogieron los días 7, 10 y 20. Alternativamente, los ratones fueron sensibilizados con una inyección IP de 10^6 células 70Z3-L el día 0 enriquecidas con diferentes proporciones (0,5%, 1% y 10%) de células transducidas con el vector y las muestras de suero se recogieron de acuerdo con el mismo programa como se describió anteriormente. Los resultados de estos dos análisis se muestran en la Figura 7.

Los niveles de IL-10 inducida el día 20 son significativamente más altos después de la terapia mediada por células de leucemia en comparación con administrado IP terapia rIL-12 ($p < 0,0017$), pero no son significativamente diferentes entre los grupos tratados con IL-12 y de control para cualquier modo suministro en cualquier punto temporal. Del mismo modo, los niveles de IFN- γ y TNF- α son significativamente superiores en respuesta a IL-12 secretada a partir de células transducidas con el vector ($p < 0,0015$ y $0,0110$ respectivamente). Cabe destacar, sin embargo, que los grupos de tratamiento mediado por células de leucemia muestran niveles significativamente más altos de IFN- γ que los grupos de control el día 7 ($p = 0,0007$) pero se resuelven a nivel basal en torno al día 20.

DISCUSIÓN

Los autores de la presente invención demuestran que la terapia con rIL-12 de dosis baja administrada IP puede provocar una respuesta inmunitaria protectora en ratones portadores de leucemia y que un enfoque eficaz para suministrar IL-12 es a través de las propias células de leucemia. Se necesitan sorprendentemente pocas células de leucemia transducidas para lograr una protección siembre que se produzca una cantidad suficiente de IL-12 por célula, y que la protección se logre de una manera distinta de la de la terapia con rIL-12 administrada IP.

Dado el papel clave que la IL-12 juega en el comienzo de las respuestas inmunitarias eficaces en diversos modelos de leucemia, se volvió a examinar la posibilidad de la terapia con citoquinas utilizando un modelo murino de LLA. Anteriormente se había encontrado que las células 70Z/3-L conducen a la rápida muerte de los ratones a los que se había inyectado tan pocas como 10^2 células. En contraste, se establecieron las variantes de esta línea que son reconocidas por el sistema inmunitario y posteriormente rechazadas. La mezcla de tan sólo 10^5 de estas variantes no leucémicas con 10^6 células 70Z/3-L dieron como resultado el rechazo completo de todas las células 70Z/3 [39]. Si bien todavía no se ha determinado por qué estas variantes son reconocidas por el sistema inmunitario, estos experimentos revelaron que las células 70Z/3-L pueden ser rechazadas si el sistema inmunitario puede ser modulado apropiadamente; haciendo este sistema experimental susceptible al estudio de la actividad anti-leucemia inducida por IL-12.

Las terapias basadas en interleuquina-12 no se han convertido en los tratamientos contra el cáncer de primera línea, en parte, porque los estudios a menudo informan sobre bajas tasas de respuesta entre los pacientes [6-8]. Los malos resultados asociados con el tratamiento con IL-12 en estos estudios clínicos pueden ser explicados por la respuesta fisiológica a IL-12 inducida por IFN- γ . Por ejemplo, se ha demostrado que altos niveles de IL-12, y en consecuencia de IFN- γ , inducen IL-10 y conducen a la modulación negativa de la capacidad de respuesta de IL-12 en el anfitrión [6]. Sin embargo, Gollob et al. informan de que la activación inmunitaria crónica similar a T auxiliar de tipo 1 que implica la producción de IFN- γ es necesaria para los efectos antitumorales inducidos por rIL-12 [18].

Grupos anteriores han demostrado que la administración de IL-12 a dosis significativamente inferiores a la dosis máxima tolerada puede evitar la inducción de mecanismos antagónicos [20]. Los autores de la presente invención demostraron que la administración IP de una dosis tan baja como 10-20 ng de rIL-12 al día durante 14 días, equivalente a 500-1.000 ng/kg, es suficiente para aumentar significativamente la supervivencia de los ratones a los que se había inyectado 70Z/3-L. Esta dosis es eficaz contra una carga de leucemia establecida y el rechazo

conduce a la memoria inmunológica a largo plazo de una manera dependiente de las células T.

Se investigaron otras estrategias para el suministro de IL-12. Las células 70Z/3-L puede ser fácilmente transducidas con la construcción lentiviral novedosa de los autores de la presente invención. Diferentes clones transducidos con el vector producen diversas cantidades de IL-12. Esto parece ser un rasgo estable puesto que los autores de la presente invención han medido niveles similares de IL-12 secretada para cada clon en 2-5 ocasiones independientes. Se determinó el número de copias del vector en estos clones, pero esto por sí solo no explica los niveles de secreción variables, ni su tasa de proliferación. Una explicación posible, sin embargo, es que la secreción variable es un resultado de diferentes sitios de integración y el efecto de diferentes genes que controlan la regulación de transgenes.

El establecimiento de clones que producen diferentes niveles de IL-12 ha permitido examen de la relación entre la producción de IL-12 y la proporción de células 70Z/3-L transducidas con el vector IL-12⁺ vs. IL-12⁻ no sometidas a tratamiento previo necesarias para la activación inmunitaria. Hasta la fecha, este aspecto potencialmente crítico de la terapia con citoquinas mediada por células no se ha examinado a fondo. Una proporción muy pequeña de células 70Z/3-L transducidas con el vector que producen IL-12 es suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria protectora. Para un clon, LV12.2, fueron suficientes 5.000 de tales células transducidas con el vector (pero no 1.000) para salvar 80% de los ratones a los que se habían inyectado 10⁶ células 70Z/3-L. Este resultado podría indicar que se requiere un número crítico de "éxitos" o una cantidad suficiente de IL-12 para desencadenar una respuesta inmunitaria. Una interpretación razonable de "éxito" podría ser un encuentro entre una célula 70Z/3-L transducida con el vector productora de IL-12 y una APC adecuada, tal como una DC. La explicación alternativa propuesta es que estas 5.000 células transducidas con el vector simplemente proporcionan una cantidad suficiente de IL-12 al sistema para desencadenar una respuesta inmunitaria de una manera más directa. Para determinar cuál de estas explicaciones es correcta, se empleó un clon diferente, LV12.3, que produce 10 veces menos IL-12 por célula. Los números titulados de células transducidas con el vector se inyectaron junto con las 10⁶ células 70Z/3-L no sometidas a tratamiento previo. Incluso 100.000 de estas células transducidas con el vector fracasaron para conferir protección. Esto representa veinte veces más células y dos veces la IL-12 potencial liberada al sistema. En conjunto, estos resultados sugieren que es el número de "éxitos" lo que importa en lugar de la cantidad absoluta de IL-12, pero para calificarla como un "éxito", la célula 70Z/3-L transducida con el vector debe producir IL-12 por encima de un cierto umbral.

Estos resultados tienen implicaciones importantes para el diseño de pruebas clínicas y pueden explicar, al menos parte de las diferencias observadas entre los estudios murinos, en los que la IL-12 puede iniciar una respuesta inmunitaria curativa, y los estudios en seres humanos, en los que la respuesta inmunitaria es modesta y la supervivencia del paciente no resulta normalmente afectada. Los protocolos utilizados en los estudios en ratón implican por lo general la selección de clones que secretan niveles relativamente elevados de IL-12 y con frecuencia la preparación administrada se compone de 100% de células cancerosas que secretan IL-12. En contraste, los estudios en seres humanos se basan generalmente en poblaciones recién obtenidas de células cancerosas que son difíciles de clonar. Por lo tanto se transducen poblaciones masivas de células y se miden cantidades promedio de IL-12 producida por estas poblaciones. En los casos referidos hasta la fecha, estas cantidades medias están muy por debajo de la que se pronostica que es necesaria para provocar una inmunidad protectora y no hay información sobre la distribución de los niveles de producción dentro de estas poblaciones.

La actividad anti-leucemia inducida por IL-12 en los dos modelos de los autores de la presente invención es dependiente de células T, pero los subconjuntos que son críticos difieren dependiendo del modo de suministro de IL-12. El papel del IFN- γ también parecía ser diferente, impulsando a los autores de la presente invención a considerar su regulación *in vivo* junto con algunas otras citoquinas inflamatorias. Esto se llevó a cabo utilizando un análisis de esferas de citoquinas basado en citometría de flujo. La regulación de IL-10, IFN- γ y TNF- α tiene particular interés en los sistemas modelo de los autores de la presente invención porque la IL-10 es conocida por ser el antagonista más biológicamente relevante de IL-12 [4], IFN- γ puede mediar los efectos de la IL-12 [4, 13] y se requiere una combinación de IFN- γ y TNF- α para el desarrollo de los CTL CD4⁺[5].

El hecho de que la producción de IL-10 no se elevara por encima del fondo en cualquiera de nuestros grupos de tratamiento sugiere que la cantidad de IL-12 administrada fue suficientemente baja como para evitar la inducción de moléculas antagónicas y la amortiguación del efecto biológico. Los niveles medidos de IFN- γ fueron significativamente mayores en los grupos tratados que recibieron IL-12 producida por células de leucemia en comparación con controles del día 7, pero no fueron significativos el 10 y regresaron a los valores iniciales el día 20. Además, la producción de IFN- γ fue significativamente mayor en el modelo mediado por células de leucemia en general. A la luz de estos resultados, es probable que el experimento de neutralización de la terapia con IL-12 mediada por células de leucemia no demostrara un papel crítico para el IFN- γ , simplemente debido a que el anticuerpo neutralizador fue superado por los niveles producidos. Existe una extensa bibliografía que describe cómo IL-12 conduce al aumento de la maduración de las CD, la producción de IFN- γ y la presentación de antígenos más eficaz por la regulación al alza dependiente de IFN- γ de MHC-II y la expresión de moléculas co-estimuladoras. Los linfocitos T auxiliares son impulsados por IFN- γ a diferenciarse con un perfil funcional de tipo-1 y, posteriormente, la

promueven la fuerte respuesta de CTL CD8⁺ que los autores de la presente invención han observado con la terapia con rIL-12 administrada IP. Sin embargo, también existe una bibliografía que describe un papel para los CTL CD4⁺ en modelos de infección [5, 40, 41] y más recientemente en la inmunología tumoral [42-46]. Es posible que un ambiente rico en IFN- γ y TNF- α resultante de la terapia mediada por células de leucemia condujera al desarrollo de una población CD4⁺ efectora. Esto podría explicar la importancia diferencial de los subconjuntos de células T en los dos modelos de los autores de la presente invención y explicar los distintos resultados de los experimentos de neutralización. La idea central de la investigación de la vacunación tumoral se ha centrado tradicionalmente en el direccionamiento de los CTL CD8⁺, que requieren la estimulación por una población de células T CD4⁺ auxiliares, para afectar la eliminación del tumor, pero la respuesta clínica ha sido limitada. Las células efectoras CD4⁺ de direccionamiento directo pueden ser importantes para lograr una respuesta anti-tumoral más robusta.

A pesar de los efectos beneficiosos de IFN- γ que han destacado anteriormente los autores de la presente invención, una amortiguación de la respuesta con la administración repetida es todavía un asunto importante en modelos de terapia con IL-12. Un atributo importante del modelo mediado por células de leucemia de los autores de la presente invención es que se inicia una respuesta inmunitaria suficiente y la leucemia se elimina pero la señal es autolimitante porque la fuente de IL-12 en el sistema son las células cancerosas que son, por sí mismas, el objetivo de la terapia. A medida que son rechazadas las células de leucemia, se reduce la fuente y los niveles de IFN-gamma regresan al valor inicial sin un aumento significativo en la molécula antagónica de IL-10.

La IL-12, administrada a dosis por debajo del nivel que conduce a la inducción de mecanismos antagónicos, es suficiente para poner en marcha una respuesta inmunitaria protectora contra las células de LLA 70Z/3-L y la eliminación completa de la leucemia. El modo de suministro de IL-12 puede tener un profundo impacto en la naturaleza de la respuesta inmunitaria que se monta y demuestra un papel crítico para las células CD4⁺ del modelo de los autores de la presente invención mediado por células de leucemia que aparentemente no existe en el modelo de administración IP de los autores de la presente invención. Aunque estudios previos se han ocupado de los efectos secundarios contraproducentes que resultan de niveles elevados de IFN- γ inducido por IL-12, se han demostrado varios papeles críticos y beneficioso para esta citoquina. Además, en el modelo de los autores de la presente invención, no se observó una amortiguación potencialmente problemática de la respuesta inmunitaria, posiblemente debido a la naturaleza autolimitante del enfoque de la terapia mediada por células de leucemia empleado.

Este trabajo en un modelo murino de LLA utilizando un LV construido de manera que modifica genéticamente la expresión de IL-12 murina ha demostrado que los animales pueden ser completamente protegidos de la muerte inducida por leucemia cuando son producidos ciertos niveles de IL-12 por las células trasplantadas.

Ejemplo 2

Leucemia mieloide aguda

Las siguientes líneas de leucemia mieloide se transdujeron con la construcción de IL-12 de LV murino.

Se construyó y caracterizó un vector lentiviral, (pHR-cPPT-EF1-muIL-12-WPRE) que modifica genéticamente la expresión de la interleuquina-12 murina (mIL-12). El plásmido pORF-mIL12 (IL-12elasti (p35::p40) Mouse (p35::p40)) se modificó mediante la creación sitios de enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, aguas arriba y aguas abajo del gen muIL-12, respectivamente, utilizando un QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). A continuación, esta construcción resultante se digirió con *EcoRI/BamHI* (New England Biolabs). El ADNc de IL-12 murino se purificó después de la electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y a continuación se subclonó en la cadena principal de LV de pHR¹ aguas abajo del promotor del factor de elongación 1 α (EF1). Los clones plasmídicos positivos para pHR-cPPT-EF1-muIL-12-WPRE (es decir LV-muIL-12) se identificaron mediante análisis de digestión con enzimas de restricción de diagnóstico y posterior secuenciación de ADN (Innobiotech, Toronto, ON, Canadá).

El lentivirus fue producido mediante la transfección de células 293T con los plásmidos pCMV Δ R8.91, pMDG y cualquier lentivector enGFP de control (pHR-Cppt-'EF-GW-SIN). Los sobrenadantes virales se recogieron a las 48 horas después de la transfección, se filtraron y se concentraron por ultracentrifugación. El virus concentrado se diluyó seriadamente y se evaluó la eficacia de la producción viral mediante la detección del antígeno p24 mediante ELISA.

Para determinar la eficacia de transducción del lentivirus mIL-12 murino se infectaron líneas de leucemia mieloide murina MMB3.19 y C1498 (1 millón de células/mL) in vitro con mIL-12 o lentivirus enGFP a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. Las células infectadas se mantuvieron a 37°C y los medios se cambiaron 24 horas después del cultivo. El sobrenadante se recogió 48 horas más tarde y los niveles de IL-12 se midieron mediante ELISA.

Las células transducidas in vitro con el lentivirus que codificaba mIL-12 producen eficientemente altas concentraciones de IL-12 [~214 ng/mL y 7,5 ng/mL para las células MMB3.19 y C1498, respectivamente]. Las

células MMB3.19-IL-12 y C1498-IL-12 secretan 214 y 7,5 veces más IL-12, respectivamente, que las células transducidas con enGFP. Los resultados se ilustran en el siguiente cuadro y en la Figura 8a.

| | GFP | MIL-12 |
|---------|-----|--------|
| MMB3.19 | 0,9 | 214,7 |
| C1498 | 0,9 | 7,5 |

5 **Ejemplo 3**

IL-12 humana

10 **I. Construcción del vector lentiviral.**

Los vectores lentivirales que expresan el ADNc de IL-12 humana se construyeron mediante un método similar al descrito para la construcción de IL-12 de ratón. El ADNc de IL-12 humana se obtuvo como una forma de fusión a partir InvivoGen (pORF-hIL12 (IL-12elasti(p35::p40)). El marco de lectura abierto del gen se amplificó con los siguientes cebadores de PCR: hIL12 ORF Fwd, 5'-TTGGCGCGCCACCATTGGGTCACCAGC-3'; y hIL-12 ORF Rev, 5'-TTGGCGCGCCTTAGGAAGCATTTCAGATAGCTCATCACTC-3'. El producto de PCR se subclonó a continuación en la cadena principal Lentiviral (pHR'-cPPT-EF1a-WPRE) de los autores de la presente invención. La construcción se confirmó mediante análisis de digestión con enzimas de restricción de diagnóstico y posterior secuenciación del ADN.

20 **II. Experimento de transfección**

Para evaluar la construcción pHR'-cPPT-EF1a-hIL12-WPRE, las células 1×10^6 293T fueron transfectadas con la construcción, el molde de IL-12 humana pORF-hIL12 o el lentivector vacío pHR'-cPPT-EF1a-WPRE. El sobrenadante celular se recogió 24 y 48 horas después de la transfección. El nivel de hIL-12 se midió mediante ELISA (BD Pharmingen, San Diego, CA) (Cuadro a continuación de la Figura 8b).

III. Transducción a células 293 T

30 Los lentivirus que portan el marco de lectura abierto de hIL-12 (LV- hIL-12) se produjeron por medio de un método de triple transfección transitoria utilizando pHR-cPPT-EF1 α -hIL-12-WPRE y plásmidos accesorios en monocapas 293T con polietilenimina. El sobrenadante de virus se recogió 24 y 48 horas después de la transfección. Para someter a ensayo la capacidad de transducción de LV-hIL1, las células 293T 1×10^6 fueron transducidas con el sobrenadante de virus. El nivel de expresión de hIL-12 en el sobrenadante celular se midió por medio del mismo análisis ELISA como se mencionó anteriormente (Cuadro a continuación de la Figura 8b).

35 **IV. Transducción a células AML.1**

Se obtuvo una concentración de 200 veces de virus LV-hIL12 mediante ultracentrifuga. Para someter a ensayo la capacidad de transducción del virus a otras líneas celulares tumorales, se transdujeron 0,5 o 1 millón de células AML.1 (una línea celular de leucemia aguda) con virus LV-hIL12 concentrado diluido 1/100. El nivel de expresión de hIL-12 en el sobrenadante celular se midió por medio del mismo análisis ELISA como se ha mencionado anteriormente (Figura 8c).

| | 24h | | 48h | |
|------------|---------------|---------|---------------|--------|
| | Prom. (pg/mL) | DT | Prom. (pg/mL) | DT |
| LV-hIL12 | 1010,052 | 33,145 | 840,397 | 24,184 |
| pHR-hIL12 | 774,131 | 340,254 | 933,513 | 50,522 |
| pORF-hIL12 | 1079,439 | 62,461 | 959,165 | 19,813 |
| vector pHR | 0 | 1,762 | 0 | 3,98 |

45 Se utilizará LV-hIL12 para transducir otras líneas de células leucémicas humanas y células de cáncer primario derivadas de sujetos con leucemia.

Ejemplo 4

Leucemia mieloide crónica en seres humanos

La inmunoterapia ofrece un método para mejorar el tratamiento de las leucemias, en particular combinada con otras modalidades de tratamiento. De hecho, es posible que la única terapia potente que invoca el sistema inmunitario sea eficaz en la erradicación completa de la leucemia ya que a menudo existe enfermedad residual en pacientes que están en remisión, que se puede volver a activarse más tarde. Esto se verifica especialmente para la leucemia mieloide crónica (LMC), un trastorno clonal que implica al cromosoma Filadelfia, que representa 15% de todas las leucemias de adultos. Por otro lado, esta progresión de la enfermedad retardada proporciona una ventana de oportunidad clave para la inmunoterapia. Puesto que la inmunoterapia no depende de la anulación de las funciones celulares mediante la interrupción de la señalización o en la intercalación en el ADN mediante moléculas pequeñas, por ejemplo, también puede ser eficaz en células transformadas que son quiescentes o habitan lugares inaccesibles. De importancia, la inmunoterapia puede ser una manera eficaz para dirigirse a células madre de cáncer verdaderas. Por último, debido a la naturaleza de circulación y la vigilancia del sistema inmunitario, la enfermedad metastásica existente incluso en pacientes con LMC primarias podría ser tratada por medio de este enfoque.

Aproximadamente 4.500 nuevos pacientes son diagnosticados con LMC en América del Norte cada año. El inicio de la forma más frecuente de LMC se asocia con una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 que conducen a la formación del oncogén Bcr-Abl. Esto se manifiesta por una rápida expansión de células hematopoyéticas derivadas de médula ósea del linaje mieloide. La terapia de primera línea actual implica el tratamiento de pacientes con LMC con mesilato de imatinib (Gleevec®), un inhibidor de tirosina quinasa de molécula pequeña del producto de Bcr-Abl. Por desgracia, éste no es un tratamiento curativo. De hecho, 4% de los pacientes con LMC en fase temprana y un total de 50% en etapa avanzada desarrollan resistencia a imatinib debido principalmente a mutaciones ABL1 (1). Otro tratamiento con imatinib, también es costoso y requiere la ingestión de toda la vida del fármaco; no se conocen los efectos de la administración prolongada (o de otros de esta clase). También es probable que esta estrategia no tenga efecto sobre la célula madre cancerosa, que puede ser relativamente quiescente y por lo tanto resistente a la modulación metabólica. Igualmente, la falta de especificidad del inhibidor únicamente para el producto de Bcr-Abl significa que otras tirosina quinasas también pueden verse afectadas. Como tal, imatinib ha mostrado algunos efectos secundarios graves; un estudio reciente ha demostrado que los ratones y los pacientes humanos que reciben imatinib demuestran cardiotoxicidad grave (2).

Se ha previsto una amplia gama de estrategias de inmunoterapia. De hecho, se ha sabido durante años que el sistema inmunitario es capaz de reconocer y limpiar las células cancerosas en algunos casos y, sin embargo no en otros. Las citoquinas tienen efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmunitario. Una citoquina que ha recibido mucha atención hacia la mejora de cáncer es la interleuquina-12 (IL-12). La IL-12 es heterodimérica y actúa aumentando la presentación de antígenos por las células dendríticas (DC) e induciendo su maduración. El concepto básico detrás de la terapia de utilización de IL-12 es que alerta al sistema inmunitario a un mayor grado de vigilancia y si esta atención puede ser dirigida contra las células cancerosas, la eliminación por el sistema inmunitario puede ser posible. La IL-12 ha sido administrada en forma de un bolo sistémico para el tratamiento de leucemias, pero los resultados clínicos han sido bastante modestos. Esto puede ser debido a las dificultades en el establecimiento de la dosis apropiada por paciente y a las toxicidades periféricas graves observadas.

Interleuquina-12 (IL-12). La IL-12 es una citoquina heterodimérica con múltiples efectos biológicos sobre el sistema inmunitario. Se compone de dos subunidades, p35 y p40, las cuales son necesarias para la secreción de la forma activa p70. La IL-12 actúa sobre las DC, lo que lleva a un aumento de la maduración y la presentación de antígenos, que puede permitir la iniciación de una respuesta de células T contra antígenos específicos de tumores. También impulsa la secreción de IL-12 por las DC, creando un mecanismo de retroalimentación positivo para amplificar la respuesta. Una vez que se inicia una respuesta, IL-12 dirige el sistema inmunitario hacia un perfil de citoquinas Th1, induciendo a células T CD4⁺ a secretar IFN- γ y conduciendo a una respuesta de células T citotóxicas CD8⁺ (3). Sin embargo, IL-12 es también una fuerte citoquina pro-inflamatoria que conduce a la secreción de otras citoquinas, incluyendo TNF- α que, combinado con IFN- γ , es un requisito previo para el desarrollo de linfocitos T citotóxicos CD4⁺ (CTL; ref. 4). Además, la IL-12 puede promover la activación de macrófagos y eosinófilos a través de la inducción de IFN- γ y de otras citoquinas. Esto conduce a la secreción de IL-12 y a la amplificación adicional tanto de las respuestas innatas como adquiridas (3). Sin embargo, altos niveles de IL-12, y en consecuencia de IFN- γ , también se han asociado con la inducción de moléculas antagónicas tales como IL-10 y el agotamiento de moléculas de señalización aguas abajo de IL-12, tales como STAT4 (3, 5-7).

Lentivirus (LV) y terapia génica. El primer ensayo clínico de terapia génica aprobado fue publicado en 1989. Desde entonces han recibido hasta la fecha terapia génica >2500 pacientes en todo el mundo.

La seguridad es una alta prioridad. Un sistema vector importante que ha sido el responsable de generar entusiasmo renovado se basa en los LV. Los LV se obtienen lo más comúnmente a partir de VIH-1 (17). Segmentos sustanciales del genoma viral se han suprimido y se han añadido elementos de seguridad adicionales, tales como LTR de auto-inactivación (18). Por otra parte, estos vectores se producen ahora en modalidades para reducir la posibilidad de recombinación desarrollando lentivirus de replicación competente (RCL). De hecho, se ha destinado un esfuerzo

considerable a probar la seguridad y eficacia de esta plataforma; por ejemplo, los LV ofrecen integración estable pero con menos inserción en promotores que puede perturbar las funciones celulares que se producen con los onco-retrovirus. Los LV también permiten la posibilidad de diseñar la expresión concomitante de más de un gen. Varios de estas construcciones bicistrónicas han sido generadas por los autores de la presente invención (véase la ref. 19, 20).

5 Las construcciones de LV comprenden un nuevo sistema de control de suicidio. Esta combinación enzima/profármaco emplea una enzima humana modificada por ingeniería genética para responder a AZT (ref. 21; véase el Comentario (ref. 22)). Este sistema de seguridad ofrece la capacidad de controlar el destino de las células transducidas y será práctico para su uso en cualquier entorno que implique trasplante de células tumorales, células madre, y similares.

10 Las mejoras en la seguridad y la eficiencia de los LV han llevado recientemente a pruebas clínicas. La primera prueba con LV se completó en 2006 e implicó secuencias de ARN anti-sentido como transgenes que dirigían al VIH (23). Este estudio se realizó en pacientes con SIDA con altas cargas virales; se observaron algunas reducciones en estas cargas virales. Más importante aún, no se encontró RCL entre el vector recombinante y el virus de tipo salvaje endógeno. Estos resultados han conducido ahora a al menos otros 6 protocolos de LV que se han iniciado para indicaciones que incluyen cáncer y enfermedades hereditarias. Tales resultados también han dado lugar a un renacimiento del interés social en la terapia génica que todavía tiene un potencial grande, pero sin explotar para tratar una variedad de trastornos.

20 Como los autores de la presente invención han encontrado, la concentración localizada de IL-12 en la interfaz de células tumorales/DC/T puede ser relevante para la regulación al alza de la respuesta inmunitaria, y no se está generando la dosificación eficaz en ese sitio en los protocolos clínicos.

25 Las técnicas de transferencia de genes del estado de la técnica (lentivirus; LV) fueron utilizadas para modular cuantitativamente el perfil expresado de IL-12 por la propia célula tumoral. Los LV son muy eficientes en la transferencia de forma estable genes a las células.

30 Los autores de la presente invención han generado un nuevo LV orientado clínicamente que modifica genéticamente la expresión de IL-12 humana. Los virus han sido producido y los virus y el vector han sido validados en líneas celulares de cáncer humano establecidas cuantificando el título y la producción de IL-12 humana (véase la Figura 8b). Se transducirán células primarias de LMC humanas que producirán diferentes niveles de IL-12 humana. Se analizarán las células para demostrar que la IL-12 humana producida por las células transducidas es funcional. Se adaptará un modelo de xenoinjerto pre-clínico para examinar el mantenimiento de las células de LMC transducidas. Se medirá la cinética de la IL-12 humana producida in vivo.

35 Gleevec es el tratamiento de elección; sin embargo los efectos secundarios, la resistencia, la necesidad de una terapia a largo plazo, y el alto coste están asociados al uso de Gleevec.

40 **Modelos murinos de LMC.** Se sometieron a ensayo dos líneas de LMC establecidas y muestran producción diferencial de IL-12 in vitro en las poblaciones transducidas derivadas de estas líneas.

45 La LMC y la LLA son similares ya que las altas tasas de remisión en adultos están seguidas de altas tasas de recaída. Este curso clínico no sólo proporciona material inicial adecuado para infectar con las construcciones de vector descritas en la presente memoria sino una justificación para el tratamiento posterior. Es importante destacar que, la LMC muestra esta progresión bi/tri-fásica y cierta respuesta inicial a imatinib que permite tiempo para desarrollar células tumorales de modulación inmunitaria después de transducciones de vectores.

50 Los LV ofrecen algunas ventajas reales sobre otros métodos de transferencia de genes que buscan generar líneas celulares estables que secretan IL-12 para dichas aplicaciones: por ejemplo - la transfección con plásmidos es muy ineficiente y el suministro de genes mediado por adenovirus o AAV no conduce a integración del vector apreciable, que proporcionará niveles variables de IL-12 a lo largo del tiempo. Los autores de la presente invención han demostrado que las células murinas transducidas expresan de forma estable transgenes ~ 2 años después de la infección inicial (24).

55 Síntesis del vector humano. Se generó un LV recombinante que modifica genéticamente la expresión estable de IL-12 humana. El ADNc para IL-12 humana se obtuvo como una forma de fusión de InVivogen (pORF con IL-12elasti(p40::p35)). Este ADNc se subclonó como antes en la cadena principal de LV de pHR¹. Se realizaron digestiones con enzimas de restricción de diagnóstico y secuenciación de ambas cadenas de ADN para confirmar la fidelidad de la nueva construcción. Esta primera construcción será monocistrónica; otras construcciones pueden emplear la estrategia suicida de los autores de la presente invención que implica la timidilato quinasa mutada mencionada anteriormente (21) que añadiría otra capa de seguridad.

60

Generación de poblaciones de vectores de alto título. Se generaron y se titularon in vitro provisiones de partida de alto título de viriones recombinantes. Las provisiones de partida de vectores de alto título se establecieron por

ultracentrifugación de los sobrenadantes recogidos y agrupados después de transfecciones de plásmidos triples de células 293T como se ha realizado anteriormente (20). El vector sometió a pseudotipificación con la glicoproteína de VSV-G que permite infectar una amplia gama de células. Después de obtener título suficiente del vector de suministro de IL-12 humana de pHR', las provisiones de partida de vectores agrupados serán sometidas a ensayo mediante un análisis 'Directo' para asegurarse de que no se ha generado RCL. En este análisis, las células 293T receptoras se infectan una sola vez y a continuación se cultivan durante varios de pases. Después de 4-6 semanas, los sobrenadantes de estas células infectadas se recogen y se utilizan para infectar células no sometidas a tratamiento previo. Estas células se cultivan y a continuación se someten a ensayo mediante análisis funcionales y PCR sobre el ADN genómico aislado para determinar si el vector se ha transmitido funcionalmente a estas dianas receptoras secundarias.

Pruebas en células 293T. Se determinará el nivel de IL-12 humana producida en comparación con el número de copias del vector en las células infectadas. En primer lugar, se infectarán células 293T a un intervalo de MOI modesto de aproximadamente 0,1 a 100. Los sobrenadantes de los agrupamientos de células infectadas, realizados por triplicado, se examinarán para determinar la producción de IL-12 humana mediante ELISA. A continuación, se establecerán los clones de células individuales mediante dilución limitante. Estas líneas celulares se examinarán para determinar la producción de IL-12 humana con respecto a las copias de provirus integrado - medida mediante transferencias Southern. Los controles se componen de células 293T infectadas con un virus LV/eGFP construido previamente (19). Esta información proporcionará información referente a las MOI relativas que se deben utilizar y permite la correlación de la secreción de esta forma humana de IL-12 con el número de copias relativo del vector. El uso de esta línea celular estable proporcionará un punto de referencia para la titulación de todas las preparaciones virales futuras que se elaboran con la intención de infectar las células de LMC del paciente, que pueden tener una considerable variabilidad en las frecuencias de infección de muestra a muestra.

Pruebas en LMC humana. En primer lugar, las líneas celulares de LMC establecidas se infectaron a varias MOI y las poblaciones clonales se evaluarán para determinar la expresión de IL-12 con respecto al número de copias del vector. Se ha demostrado por los autores de la presente invención que K562 (una línea de LMC) es infectada fácilmente y productivamente con los LV recombinantes (21). Se pueden obtener numerosos clones de cada agrupamiento y examinar para determinar la copia del vector y la producción relativa IL-12 humana. La viabilidad celular de los clones que producen diversos niveles de IL-12 humana a lo largo del tiempo se mide mediante ensayos de incorporación de timidina. Las células se cultivarán durante muchas semanas y se compararán con clones originales congelados inicialmente después de la dilución limitante para determinar si la producción de IL-12 humana cambia a lo largo del tiempo. La estabilidad del vector también se medirá en estas células mediante análisis de transferencia Southern repetida. En segundo lugar, se obtuvieron células de LMC humanas primarias a partir de un mínimo de 3-5 donantes de LMC inicialmente para reducir la dependencia de una sola muestra. A continuación las células se infectaron a 2 o 3 MOI diferentes. Las células de cada donante serán manejadas por separado para dar información sobre la variabilidad que se puede esperar. Como anteriormente, la producción de IL-12 humana se midió por ELISA con respecto al número de copias del vector.

Se obtuvieron datos pre-clínicos adicionales. A partir de varias líneas clonales K562 y Jurkat transducidas, se determinará la secuencia de ADNc de IL-12 humana a partir del provirus integrado en el ADN genómico después de amplificación mediante PCR y subclonación en un plásmido estable. Esto proporcionará información sobre la estabilidad del propio vector y si se producen recombinaciones que pudieran disminuir los niveles de expresión de proteínas a partir de un número de copias del vector dado. Si se observan alteraciones consistentes en una variedad de clones, tales secuencias podrían ser mutadas para reducir el solapamiento o alterar la estructura secundaria del ARNm para favorecer el mantenimiento de la fidelidad. Adicionalmente se analizará el sitio de integración del vector de poblaciones de células mediante LM-PCR para determinar la clonalidad. También será importante determinar que la IL-12 humana secretada por los clones de LMC transducidos es funcional. Para esto, se utilizarán cultivos de DC primarias humanas para examinar la estimulación y el aumento de la proliferación de células T en comparación con los controles.

Se determinará si las células de LMC primarias transducidas por el vector que han experimentado la detención del crecimiento (por irradiación de dosis muy alta, por ejemplo) en la preparación de infusiones clínicas seguras en pacientes son todavía capaces de secretar niveles similares de IL-12 humana en comparación con las células de control. No se esperan diferencias puesto que otras han demostrado expresión estable de GM-CSF y CD40L, por ejemplo, en células de leucemia del paciente después de la irradiación (25). Un grupo incluso informó sobre la expresión transgénica mejorada en células de leucemia después de irradiación y (26). Además, se puede añadir el componente de gen suicida mencionado anteriormente, y se evaluará la eficacia de destrucción de las células de LMC primarias transducidas bicistóricamente que producen IL-12 humana después de la adición de AZT a las concentraciones que han utilizado anteriormente los autores de la presente invención (21).

Ensayo de cultivo de células de LMC in vivo. Las líneas celulares se evalúan para determinar el crecimiento in vivo. Las células se introducirán en ratones NOD/SCID inmunodeficientes y los ratones se examinarán para determinar la persistencia de las líneas celulares de LMC transducidas y las células de pacientes primarios in vivo en este modelo

de xenoinjerto. Este modelo muestra el injerto estable de células hematopoyéticas humanas, especialmente cuando se proporciona un anticuerpo para reducir la actividad de las células NK murinas. El anticuerpo anti-CD122 (24) de una línea celular de hibridoma se purifica en cantidades de miligramos. El anticuerpo anti-CD122 aumenta el injerto de células humanas en ratones NOD/SCID. Los ratones NOD/SCID fueron o bien no pre-tratados ($n = 3$) o bien pre-tratados con anti-CD122 (200 μg ; inyección i.p.; $n = 3$). Veinticuatro horas más tarde, los ratones se irradiaron (350 cGy; fuente de ^{133}Cs) y se les inyectaron i.v. 7×10^5 células CD34⁺ humanas derivadas de sangre de médula purificada. A las 7 semanas del trasplante, se recogió la médula ósea, y el injerto de células humanas se determinó por citometría de flujo utilizando anti-CD45 PE humano. Dos de los tres receptores de control carecían de injerto de células humana a largo plazo, como se define por 1% eventos CD45⁺. Tanto las células crecimiento detenido y células transducidas no manipuladas se proporcionarán a diversas dosis a ratones NOD/SCID receptores. La persistencia de células de LMC transducidas se determinará mediante análisis convencionales que implican citometría de flujo para los antígenos de superficie de células humanas (tales como CD45/CD71), junto con análisis de RT-PCR para el LV como se ha realizado para la fusión del oncogen Bcr-Abl (27). Estos estudios serán importantes para demostrar que las células de LMC comprenden las poblaciones primarias en los animales xenoinjertados. A su vez, los niveles circulantes de IL-12 humana específica se determinarán mediante ELISA; también se mide la producción de citoquinas secundarias tales como IFN- γ .

Cuando el vector bicistrónico que modifica genéticamente la expresión del nuevo gen de suicidio, la eficacia de la destrucción de células transducidas in vivo puede medirse después de la adición de AZT a los animales - la dosificación que está por debajo del nivel de toxicidad sistémica se describe en (21). Se desarrolla un sistema de trasplante completamente adaptativo en este modelo de xenoinjerto en donde las células modificadas genéticamente coincidentes se devuelven a los animales previamente reconstituidos con componentes hematopoyéticos de pacientes autólogos. Se determina la dosis óptima de IL-12 con respecto a la respuesta inmunitaria. Se evalúan el efecto de la adición de otras moléculas co-estimuladoras o citoquinas alternativas que perturban la respuesta inmunitaria invocada positiva o negativamente. También se evalúan lentivectores que expresan los ARNhc que regulan negativamente la expresión de genes importantes que pueden efectuar estimulación tales como IL-10. También se evalúa la contribución de diferentes poblaciones de las propias células hematopoyéticas utilizando estudios de agotamiento y de agregación "add-back" mediados por clasificación.

30 Ejemplo 5

Las células de leucemia de 4 donantes de cada grupo (LMC, AML, LLC, LLA) se enriquecerán, seguido de centrifugación con Ficoll mediante protocolos establecidos. Inicialmente, para la AML y la LLA los autores de la presente invención seleccionarán cuidadosamente a los pacientes con alto nivel de leucocitos ($> 60\text{k}$) y alto recuento de blastos en cuyo caso los autores de la presente invención esperan enriquecimientos que superen 95% de pureza. Para la LMC, se seleccionarán pacientes en crisis blástica para conseguir el mismo resultado. Para la LLC se lograrán linfocitos de LLC maduros de pacientes con recuentos muy altos de leucocitos ($>100\text{k}$) para alcanzar este enriquecimiento. En cada experimento, la población de células de leucemia se infectará a 3 MOI diferentes utilizando la construcción LV/huIL-12 de los autores de la presente invención y un control LV/enGFP. Se está desarrollando un análisis de inmunotransferencia ligado a enzimas (ELISPOT) para su uso como una lectura en estos experimentos. Las líneas murinas estables clonadas producen un intervalo de IL-12 de 200-40000 $\text{pg}/10^6/\text{ml}/2\text{hrs}$ y sirven para calibrar el análisis ELISPOT mediante la correlación del tamaño de punto con niveles de secreción conocidos a nivel celular de la señal. Se creará un conjunto de calibración similar con líneas celulares establecidas humanas mediante subclonación después de la transducción de LV/huIL12 primaria. El ensayo ELISPOT permitirá a los autores de la presente invención cuantificar no sólo el porcentaje de células de leucemia primarias que expresan IL-12 del vector IL-12 transducido, sino que también proporcionará una distribución de los niveles de producción de IL-12. El análisis se desarrollará para producir de forma fiable al menos 10% de las células de leucemia que expresan al menos 20000 $\text{pg}/10^6/\text{ml}/2$ hr. Las células primarias se congelarán y descongelarán y se volverán a someter a ensayo para determinar la estabilidad de esta distribución. Las células primarias también se irradiarán y se volverán a someter a ensayo para determinar la producción y distribución de los niveles de IL-12. Los protocolos clínicos que utilizan estas poblaciones servirían como vacunas basadas en células autólogas que van a ser utilizadas para prevenir la recaída en pacientes que logran CR.

55 Ejemplo 6

Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

Del mismo modo que se describe para la LMC, se elaborarán y se someterán a ensayo células de LLA transducidas con una construcción de IL-12 de LV.

Ensayos en células de LLA humanas. En primer lugar, se infectarán líneas celulares de LLA establecidas a diversas MOI y se evaluarán las poblaciones clonales para determinar la expresión de IL-12 en relación con el número de copias del vector. Los autores de la presente invención han demostrado que las células Jurkat (una línea de LLA) se infectan fácilmente y productivamente con LV recombinantes (21). Se obtendrán numerosos clones de cada grupo y

se examinarán para determinar las copias del vector y producción relativa de IL-12 humana. La viabilidad celular de clones que producen diversos niveles de IL-12 humana a lo largo del tiempo se medirá mediante análisis de incorporación de timidina. Las células se cultivarán durante muchas semanas y se compararán con clones originales congelados inicialmente después de una dilución limitante para determinar si la producción de IL-12 humana cambia con el tiempo. La estabilidad del vector también se medirá en estas células mediante análisis repetidos de transferencia Southern. En segundo lugar, se obtienen células de LLA humana primarias a partir de un mínimo de 3-5 donantes con LLA inicialmente para reducir la dependencia de una sola muestra. Aquí células se infectan a 2 o 3 MOI diferentes. Las células de cada donante se manejan por separado para proporcionar información sobre la variabilidad que se puede esperar. Como anteriormente, se medirá la producción de IL-12 humana por medio de ELISA en relación con el número de copias del vector.

Se obtendrán datos pre-clínicos adicionales. A partir de numerosas líneas clonales K562 y Jurkat transducidas, se determinará la secuencia del ADNc de la IL-12 humana a partir de provirus integrado en el ADN genómico después de la amplificación por PCR y la subclonación en un plásmido estable. Esto proporcionará información sobre la estabilidad del propio vector y si se producen recombinaciones que podría disminuir los niveles de expresión de proteínas a partir de un número de copias del vector dado. Si se observan alteraciones constantes en una variedad de clones tales secuencias podrían ser mutadas para reducir el solapamiento o alterar la estructura secundaria del ARNm para favorecer el mantenimiento de la fidelidad. Además se analizará el sitio de integración del vector de poblaciones de células por medio de LM-PCR para determinar la clonalidad. También será importante determinar que la IL-12 humana secretada por los clones de LMC transducidos es funcional. Para esto se utilizarán cultivos de DC humanas primarias para examinar la estimulación y el aumento de la proliferación de células T en comparación con los controles.

Se determinará si las células de LLA primarias transducidas con el vector que se han sometido a la detención del crecimiento (por irradiación de dosis muy alta, por ejemplo) en la preparación de infusiones clínicas seguras en pacientes son todavía capaces de secretar niveles similares de IL-12 humana en comparación con las células control. No se esperan diferencias ya que otros han demostrado una expresión estable de GM-CSF y CD40L, por ejemplo, en células de leucemia del paciente después de la irradiación (25). Un grupo incluso informó de un aumento de la expresión del transgén en células de leucemia después de irradiación y (26). Además, el componente del gen suicida mencionado anteriormente se añade opcionalmente, y se evaluará la eficacia de destrucción de las células de LLA primarias transducidas que producen IL-12 humana después de la adición de AZT a concentraciones que los autores de la presente invención habían utilizado antes (21).

Administración de células que expresan IL-12 a un sujeto con LLA

Leucemia linfoblástica aguda: Se estima que 5.200 nuevos pacientes serán diagnosticados de LLA en los Estados Unidos en 2007 y 1.420 morirán de la enfermedad. La LLA es el más es el tipo más común de leucemia en niños con 61% de diagnósticos realizados en individuos menores de 20 años (29). La tasa de supervivencia relativa a 5 años global para el período de 1996-2003 fue de 64,0%. Hubo un cambio ligeramente positivo en el porcentaje anual (0,3%) en la incidencia de la LLA durante el periodo de 1985 a 2005 (29).

Las células hematopoyéticas malignas son células precursoras linfoides. Las anomalías citogenéticas se producen en ~70% de los casos de LLA en adultos, pero no están asociadas con un solo evento translocación como en la LMC. El curso de tratamiento normalizado ha concedido los términos inducción, consolidación, mantenimiento y profilaxis del SNC - pero incluso con una terapia intensiva solamente 20-40% de los adultos con LLA se curan con los regímenes actuales. La terapia para la LLA incluye quimioterapia convencional (vincristina, antraciclina, ciclofosfamida, L-asparaginasa etc.), terapia de radiación y trasplante de médula ósea. Se han desarrollado medicamentos más novedosos incluyendo clofarabina, nelarabina, y dasatinib, pero aquí las respuestas han sido relativamente modestas y las toxicidades siguen siendo un problema.

El imatinib también se ha utilizado en la LLA positiva para el cromosoma Filadelfia. El imatinib tiene una eficacia limitada en el tratamiento de la LLA cuando se utiliza como un solo agente, pero varios estudios han demostrado mejores resultados cuando se combina con la quimioterapia convencional (30). La clofarabina (Clolar®) fue aprobada en diciembre de 2004 para los pacientes pediátricos con tasas medias de respuesta global de LLA recurrente o refractaria de 25% (30). La nelarabina (Arranon®) fue aprobada como medicamento huérfano por la FDA en octubre de 2005 para el tratamiento de la LLA de células T. Se informa de respuestas completas en 54% de los pacientes con LLA de células T (30). Aproximadamente 700 pacientes con LLA por año en los Estados Unidos tienen LLA de células T (30).

Los medicamentos en desarrollo para la LLA incluyen Rituximab en la Fase III, AMN107 y 852a ambos en Fase II, nilotinib (Tasigna®) y AT9283 ambos en fase I/II y KW-2449 en Fase I. Las terapias basadas en células, tales como trasplante de células madre no mieloablativo y el trasplante alogénico de sangre del cordón umbilical también se encuentran en desarrollo. Los medicamentos en pruebas para tipos específicos de LLA incluyen agentes terapéuticos dirigidos a LLA de células T (T-LLA), tales como alemtuzumab (Campath®), daclizumab y denileuquina

difitox (Ontak®) todos en Fase II y de manera similar, una serie de fármacos para la LMC en pruebas para Ph + LLA tales como MK0457 y bortezomib (Velcade®), que están ambos en Fase II, SKI-606 en Fase I/II e INNO-406 en Fase I.

5 Uso clínico

Se recogen 50 ml de sangre heparanizada de pacientes después del consentimiento informado aprobado por REB. La sangre se diluye con 110 ml de medio alfa y se divide en alícuotas en tubos de centrifuga cónicos de 50 ml. Se inyecta Hypaque Ficol bajo la sangre y los tubos se centrifugan a 1600 rpm a 15°C durante 20 minutos. La capa de células mononucleares se retira y se resuspende en 100 ml de medio alfa con FCS al 5%. Las células se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos y luego se resuspenden en 10 ml de medio alfa con FCS al 5%, a continuación se cuentan las células y después se congelan para su uso futuro o se distribuyen para nuevos experimentos. Esto produciría más de 1×10^9 blastos de la sangre periférica de los pacientes.

Los blastos se recogen a partir del sujeto antes de la quimioterapia cuando se encuentran en un número muy elevado. Las células o una parte de las mismas se congelan opcionalmente. El paciente se trata con quimioterapia u otra modalidad adecuada. Después las células se descongelan, si se habían congelado, se infectan con IL-12 de LV y se analizan para determinar el nivel requerido de expresión (p.ej. el nivel umbral). Las células que satisfacen estos criterios se irradian opcionalmente, y se reintroducen en el paciente.

Cuando la construcción de vector comprende un componente génico de seguridad, las células opcionalmente no son irradiadas.

Otras células se infectan opcionalmente antes de la congelación.

Administración de células que expresan IL-12 a un sujeto con LMC

Leucemia mieloide crónica: Se estima que 4.570 personas en los EE.UU. serán diagnosticadas de LMC y 490 morirán de esta enfermedad en 2007 (30). Hubo un cambio negativo en la incidencia anual (-2,6%) de la LMC durante el periodo de 1997 a 2004 (30).

La terapia de primera línea preferida actual implica el tratamiento de pacientes con LMC con el mesilato de imatinib (Gleevec®). Se ha informado de que 4% de los pacientes con LMC en fase temprana y un total de 50% de los pacientes con LMC en fase avanzada desarrollan resistencia a imatinib (32). el tratamiento con mesilato de imatinib también requiere medicación de por vida; aún no se conocen todos los efectos de la administración prolongada de este agente (o otros de esta clase). Gleevec puede causar efectos secundarios graves tales como citopenias, particularmente anemia, neutropenia y trombocitopenia; insuficiencia cardíaca congestiva grave y disfunción del ventrículo izquierdo; hepatotoxicidad grave; hemorragia de grado 3/4 y perforaciones gastrointestinales incluyendo algunas que son mortales. En esa línea, un estudio reciente ha demostrado que los ratones y los pacientes humanos que reciben mesilato de imatinib muestran cardiotoxicidad (2); aunque la prevalencia global de este evento severamente adverso aún no ha sido verificada sistemáticamente ni se ha cuantificado con precisión.

El dasatinib (Sprycel®) se ha introducido recientemente como una terapia para los pacientes con LMC en los que ha fracasado el tratamiento con imatinib. El dasatinib también puede producir efectos secundarios graves y en ocasiones mortales: trombocitopenia, neutropenia, y anemia (grado 3 o 4 según el NCI CTC); hemorragias graves, incluyendo fallecimientos se han producido en un porcentaje significativo de pacientes (1-7% dependiendo del sitio de hemorragia). La mayoría de los episodios de hemorragia se asociaron con trombocitopenia grave. Otros efectos secundarios incluyen la retención de líquidos grave y los efectos cardíacos (prolongación QT) (33).

El nilotinib (Tasigna®) ha sido recientemente aprobado en los Estados Unidos como una nueva terapia contra el cáncer para los pacientes con LMC que son resistentes o intolerantes al tratamiento con imatinib. Al igual que el dasatinib, el nilotinib puede causar neutropenia y trombocitopenia. El nilotinib también prolonga el intervalo QT y se ha informado de muertes súbitas (34).

Otras opciones de tratamiento para los pacientes con LMC incluyen la quimioterapia citotóxica convencional, el interferón-alfa, el trasplante de médula ósea y el trasplante alogénico de células madre.

Los fármacos en desarrollo para la LMC incluyen Lonafarnib Fase III, LBH589 Fase II/III, AT9283 Fase I/II, MK0457 Fase II, Bortezomib (Velcade) Fase II, 852A Fase II, SKI-606 Fase I/II, trasplante alogénico de sangre de cordón umbilical Fase II, XL228 Fase I, KW-2449 Fase I, INNO-406 Fase I y homoharringtonina (Ceflatonin®), que ha completado recientemente la Fase I/II (35).

Uso clínico

5 Se obtienen 50 ml de sangre heparanizada de pacientes después del consiguiente consentimiento aprobado por REB. La sangre se diluye con 110 ml de medio alfa y se divide en alícuotas en tubos de centrifuga cónicos de 50 ml. Se inyecta Hypaque Ficol la bajo la sangre y los tubos se centrifugan a 1600 rpm a 15 C durante 20 minutos. La capa de células mononucleares se retira y se resuspende en 100 ml de medio alfa con FCS al 5%. Las células se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos y a continuación se resuspenden en 10 ml de medio alfa con células en FCS al 5%, a continuación se cuentan y después se congelan para su utilización en el futuro o se distribuyen para nuevos experimentos. Esto produciría más de 1×10^9 blastos de sangre periférica de los pacientes.

10 Los blastos se recogen del sujeto antes de la quimioterapia cuando su número es muy elevado. Las células o una porción de las mismas se congelan opcionalmente. El paciente es tratado con quimioterapia u otra modalidad adecuada. Después las células se descongelan si se habían congelado, se infectan con LV IL-12 y se analizan para determinar el nivel requerido de expresión (p.ej. el nivel umbral). Las células que satisfacen estos criterios se irradian opcionalmente, y se reintroducen en el paciente.

15 Cuando la construcción de vector comprende un componente génico de seguridad, las células opcionalmente no se irradian.

Otras células se infectan opcionalmente antes de la congelación.

20 **Administración IL-12 de LV a un paciente con LLC**

25 **LLC** B-LLC es la leucemia más común de los adultos con una expectativa de ~16.500 casos en América del Norte este año (Estimaciones basadas en la American Cancer Society e Informes de la Canadian Cancer Society). Se pueden lograr remisiones con análogos de la purina y terapia de anticuerpo monoclonal sin embargo, la enfermedad progresa invariablemente. Los trasplantes alogénicos de células madre pueden ser curativos, pero muchos pacientes no son elegibles para este tratamiento debido a su edad. La observación de que las respuestas GVL se producen después de trasplante de células madre confirma que una respuesta inmunitaria anti-leucemia a la LLC es posible. La progresión lenta de la LLC-B también hace que esta enfermedad sea atractiva para estrategias de inmunoterapia.

30 **Uso clínico**

35 Se recogen 50 ml de sangre heparanizada de pacientes después del consiguiente consentimiento informado aprobado por REB. La sangre se diluye con 110 ml de medio alfa y se divide en alícuotas en tubos de centrifuga cónicos de 50 ml. Se inyecta Ficol Hypaque bajo la sangre y los tubos se centrifugan a 1.600 rpm a 15 C durante 20 minutos. La capa de células mononucleares se retira y se resuspende en 100 ml de medio alfa con FCS al 5%. Las células se centrifugan a 1.000 rpm durante 10 minutos y a continuación se resuspenden en 10 ml de medio alfa con FCS al 5%. A continuación se cuentan las células y después se congelan para su uso en el futuro o se distribuyen para nuevos experimentos.

40 Esto produciría más de 1×10^9 blastos de la sangre periférica de los pacientes.

45 Los blastos se recogen del sujeto antes de la quimioterapia cuando se encuentran en un número muy elevado. Las células o una parte de las mismas se congelan opcionalmente. El paciente es tratado con quimioterapia u otra modalidad adecuada. Después las células se descongelan, si se habían congelado, se infectan con IL-12 de LV y se analizan para determinar el nivel requerido de expresión (p.ej. el nivel umbral). Las células que satisfacen estos criterios se irradian opcionalmente, y se reintroducen en el paciente.

50 Cuando la construcción de vector comprende un componente génico de seguridad, las células opcionalmente no se irradian.

Otras células se infectan opcionalmente antes de la congelación.

55 **Referencias para los Ejemplos 4, 5 y 6**

1. Piccaluga PP, Paolini S and Martinelli G. Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 110:1178-1186 (2007).
2. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB and Force T. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat.Med.* 12:908-916 (2006).

3. Portielje JE, Gratama JW, van Ojik HH, Stoter G and Kruit WH. IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination. *Cancer Immunol.Immunother.* 52:133-144 (2003).
- 5 4. Sasiain MC, de la Barrera S, Fink S, Finiasz M, Aleman M, Farina MH, Pizzariello G and Valdez R. Interferon-gamma (IFN-gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) are necessary in the early stages of induction of CD4 and CD8 cytotoxic T cells by Mycobacterium leprae heat shock protein (hsp) 65 kD. *Clin.Exp.Immunol.* 114:196-203 (1998).
- 10 5. Portielje JE, Lamers CH, Kruit WH, Sparreboom A, Bolhuis RL, Stoter G, Huber C and Gratama JW. Repeated administrations of interleukin (IL)-12 are associated with persistently elevated plasma levels of IL-10 and declining IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-8 responses. *Clin.Cancer Res.* 9:76-83 (2003).
6. Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB, Sosman JA, Dutcher JP, Vogelzang NJ and Ryan JL. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood.* 90:2541-2548 (1997).
- 15 7. Sacco S, Heremans H, Echtenacher B, Buurman WA, Amraoui Z, Goldman M and Ghezzi P. Protective effect of a single interleukin-12 (IL-12) predose against the toxicity of subsequent chronic IL-12 in mice: role of cytokines and glucocorticoids. *Blood.* 90:4473-4479 (1997).
8. Masztalerz A, Van Rooijen N, Den Otter W and Everse LA. Mechanisms of macrophage cytotoxicity in IL-2 and IL-12 mediated tumour regression. *Cancer Immunol.Immunother.* 52:235-242 (2003).
- 20 9. Zagodzdon R, Golab J, Stoklosa T, Giermasz A, Nowicka D, Feleszko W, Lasek W and Jakobisiak M. Effective chemo-immunotherapy of L1210 leukemia in vivo using interleukin-12 combined with doxorubicin but not with cyclophosphamide, paclitaxel or cisplatin. *Int.J.Cancer.* 77:720-727 (1998).
10. Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Miyagi T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M and Hayashi N. Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 61:7563-7567 (2001).
- 25 11. Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, Gately MK, Wolf SF, Schreiber RD and Storkus WJ. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J.Immunol.* 153:1697-1706 (1994).
- 30 12. Dunussi-Joannopoulos K, Runyon K, Erickson J, Schaub RG, Hawley RG and Leonard JP. Vaccines with interleukin-12-transduced acute myeloid leukemia cells elicit very potent therapeutic and long-lasting protective immunity. *Blood.* 94:4263-4273 (1999).
13. Coughlin CM, Wysocka M, Trinchieri G and Lee WM. The effect of interleukin 12 desensitization on the antitumor efficacy of recombinant interleukin 12. *Cancer Res.* 57:2460-2467 (1997).
- 35 14. Asselin-Paturel C, Megherat S, Vergnon I, Echchakir H, Dorothee G, Blesson S, Gay F, Mami-Chouaib F and Chouaib S. Differential effect of high doses versus low doses of interleukin-12 on the adoptive transfer of human specific cytotoxic T lymphocyte in autologous lung tumors engrafted into severe combined immunodeficiency disease-nonobese diabetic mice: relation with interleukin-10 induction. *Cancer.* 91:113-122 (2001).
15. Gollob JA, Mier JW, Veenstra K, McDermott DF, Clancy D, Clancy M and Atkins MB. Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. *Clin.Cancer Res.* 6:1678-1692 (2000).
- 40 16. Hoshino T, Jiang YZ, Dunn D, Paul D, Qazilbash M, Cowan K, Wang J, Barrett J and Liu J. Transfection of interleukin-12 cDNAs into tumor cells induces cytotoxic immune responses against native tumor: implications for tumor vaccination. *Cancer Gene Ther.* 5:150-157 (1998).
17. Vigna E and Naldini L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J.Gene Med.* 2:308-316 (2000).

18. Logan AC, Lutzko C and Kohn DB. Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells. *Curr.Opin.Biotechnol.* 13:429-436 (2002).
19. Silvertown JD, Symes JC, Neschadim A, Nonaka T, Kao JC, Summerlee AJ and Medin JA. Analog of H2 relaxin exhibits antagonistic properties and impairs prostate tumor growth. *FASEB J.* 21:754-765 (2007).
- 5 20. Yoshimitsu M, Sato T, Tao K, Walia JS, Rasaiah VI, Sleep GT, Murray GJ, Poepl AG, Underwood J, West L, Brady RO and Medin JA. Bioluminescent imaging of a marking transgene and correction of Fabry mice by neonatal injection of recombinant lentiviral vectors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:16909-16914 (2004).
21. Sato T, Neschadim A, Konrad M, Fowler DH, Lavie A and Medin JA. Engineered human tmpk/AZT as a novel enzyme/prodrug axis for suicide gene therapy. *Mol.Ther.* 15:962-970 (2007).
- 10 22. Baum C. I could die for you: new prospects for suicide in gene therapy. *Mol.Ther.* 15:848-849 (2007).
23. Levine BL, Humeau LM, Boyer J, MacGregor RR, Rebello T, Lu X, Binder GK, Slepshkin V, Lemiale F, Mascola JR, Bushman FD, Dropulic B and June CH. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103:17372-17377 (2006).
- 15 24. Yoshimitsu M, Higuchi K, Ramsudir S, Nonaka T, Rasaiah VI, Siatskas C, Liang SB, Murray GJ, Brady RO and Medin JA. Efficient correction of Fabry mice and patient cells mediated by lentiviral transduction of hematopoietic stem/progenitor cells. *Gene Ther.* 14:256-265 (2007).
- 25 25. Dessureault S, Noyes D, Lee D, Dunn M, Janssen W, Cantor A, Sotomayor E, Messina J and Antonia SJ. A phase-I trial using a universal GM-CSF-producing and CD40L-expressing bystander cell line (GM.CD40L) in the formulation of autologous tumor cell-based vaccines for cancer patients with stage IV disease. *Ann.Surg.Oncol.* 14:869-884 (2007).
26. Vereecque R, Saudemont A, Wickham TJ, Gonzalez R, Hetuin D, Fenaux P and Quesnel B. Gamma-irradiation enhances transgene expression in leukemic cells. *Gene Ther.* 10:227-233 (2003).
27. Eisterer W, Jiang X, Christ O, Glimm H, Lee KH, Pang E, Lambie K, Shaw G, Holyoake TL, Petzer AL, Auewarakul C, Barnett MJ, Eaves CJ and Eaves AC. Different subsets of primary chronic myeloid leukemia stem cells engraft immunodeficient mice and produce a model of the human disease. *Leukemia.* 19:435-441 (2005).
28. Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G and Anichini A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin.Cancer Res.* 13:4677-4685 (2007).
29. National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review. 2007: (2007). <http://seer.cancer.gov/>
- 30 30. Seiter K. Acute Lymphoblastic Leukemia. (2006). <http://www.emedicine.com/med/topic3146.htm>
31. Redaelli A, Stephens JM, Laskin BL, Pashos CL and Botteman MF. The burden and outcomes associated with four leukemias: AML, ALL, CLL and CML. *Expert Rev.Anticancer Ther.* 3:311-329 (2003).
32. Piccaluga PP, Martinelli G and Baccarani M. Advances in the treatment for haematological malignancies. *Expert Opin.Pharmacother.* 7:721-732 (2006).
33. Dasatinib (Sprycel®) Drug Product Label.
- 35 34. Nilotinib (Tasigna®) Drug Product Label.
35. ChemGenix Pharmaceuticals. ChemGenix Pharmaceuticals Press Release (2007). <http://www.chemgenex.com/>
36. Centers for Medicare & Medicaid Services, the US Department of Health and Human Services. 2004 Report. (2004).

37. Frost & Sullivan. U.S. Gene Therapy Markets. (2005).

38. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide online database maintained by the Journal of Gene Medicine. Gene therapy clinical trials numbers query search. (2007). (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/>)

Ejemplo 7

5

Tratamiento de tumores sólidos

Los tumores sólidos se retiran parcial o totalmente de un sujeto. El tumor sólido es opcionalmente cualquier tumor respetable. El tumor es opcionalmente un cáncer de células renales, melanoma o cáncer de próstata.

10

Se obtienen suspensiones de células individuales y las células se transducen o transfectan con una construcción de vector de IL-12 tal como hIL-12 de LV. Las células transfectadas o transducidas se irradian opcionalmente para inducir la detención del crecimiento y prevenir la división celular. Las células transducidas que comprenden construcciones de vectores que comprenden un polinucleótido activador tal como una molécula de tmpk modificada no son irradiadas ya que las células que expresan el polinucleótido activador se pueden destruir por medio de la administración del fármaco.

15

Se administra una población de células, incluyendo las células cancerosas transducidas al sujeto del que se obtuvo el cáncer. La población de células se administra, por vía intradérmica o por vía subcutánea una vez a la semana, una vez cada dos semanas, o una vez al mes durante un periodo de 3 meses. Se administran aproximadamente de 1×10^6 a 1×10^8 células.

20

El sujeto es controlado para determinar una respuesta inmunitaria anti-cancerosa y la progresión del cáncer.

25

Ejemplo 8

Modelos y sistemas de investigación

Determinación de los aspectos críticos del inicio de las respuestas contra la leucemia en el sistema murino.

30

Se estudiará la inducción *in vivo* de inmunidad anti-leucemia utilizando modelos *in vitro*. Las DC maduras en cultivo se exponen a células 70Z/3-IL-12 sólo en presencia de células de bazo. Las células 70Z/3 no transducidas no reflejan este efecto. Las poblaciones seleccionadas de células de bazo serán eliminadas sistemáticamente para determinar qué células de bazo son responsables de los efectos observados. Se utilizarán anticuerpos específicos para las subpoblaciones de células T, células NK y macrófagos, combinadas con cualquiera de MACS o FACS para determinar el agotamiento y/o enriquecimiento. Estos experimentos se llevarán a cabo en placas Transwell que permiten la separación física de los diversos tipos de células para identificar interacciones críticas célula-célula. Se ha empujado la maduración de las DC (aumento de la expresión de CD80) como primera lectura de cebado de los autores de la presente invención. Sin embargo, es posible que la maduración de DC en presencia de células 70Z/3 esté seguida de la activación de las poblaciones de células T específicas. Se utilizará el sistema *in vitro* para determinar si se inician las respuestas de células T y, de ser así, la naturaleza de esas respuestas. Se controlará la producción de citoquinas típicas de la inducción de Th1 (tal como IFN γ) así como la aparición de células T maduras CD4⁺ y o CD8⁺ específicas para las células 70Z/3. Los clones de clones de células T específicas de 70Z/3 se expandirán y se caracterizará su fenotipo de la superficie celular. Se someterá a ensayo su potencial citotóxico en análisis de liberación de Cr⁵¹ utilizando células 70Z/3 como dianas.

35

40

45

El modelo *in vivo* establecido también se utilizará para explorar la inducción de inmunidad protectora. En particular, se acometerán experimentos de transferencia adoptiva para determinar si las células CD4⁺ pueden conferir inmunidad y, si es así, si estas células son células CTL y NKT CD4⁺. Estas células serán aisladas y clonadas *in vitro* después de que se presenten en los ratones para establecer sus propiedades de crecimiento y el mecanismo de la citotoxicidad. Mediante la comparación de la inducción de inmunidad para LMA con el presente modelo de LLA, los autores de la presente invención van a estudiar por qué algunos tipos de cáncer son más inmunogénicos que otros.

50

Con este conocimiento de fondo los autores de la presente invención iniciarán los experimentos de transducción con IL-12 utilizando líneas celulares de leucemia humana establecidas que representan diferentes clases de leucemia.

55

Estos incluyen K562, CES1, OCIAML1, OCIAML2, Jurkat, Raji. El laboratorio Medin ya ha demostrado que tanto K562 y Jurkat se infectan fácilmente con vectores LV en los experimentos anteriores. Las líneas de células serán transducidas en cultivo masivo después de lo cual clones serán seleccionados por dilución límite. Los clones se examinarán para determinar la proliferación celular mediante análisis de incorporación de timidina y para determinar la producción de IL-12 por medio de ELISA. La estabilidad de la producción de IL-12 se determinará después de tiempos de cultivo celular prolongados, así como después de varios ciclos de congelación/descongelación. Se utilizó el análisis de transferencia Southern repetido para determinar el número de copias del vector y también la

60

estabilidad.

Análisis *in vitro* en seres humanos. También se utilizarán líneas celulares establecidas y muestras primarias para desarrollar análisis *in vitro* similares a los que están en curso en el sistema murino. Se han desarrollado condiciones de cultivo *in vitro* que soportan DC humanas y subconjuntos de células T. El uso de éstas como punto de partida se controlarán los efectos de las líneas celulares productoras de IL-12 y las muestras primarias en análisis a corto plazo. Los autores de la presente invención establecerán la capacidad de las líneas celulares productoras de IL-12 y muestras de leucemia primarias para influir en la maduración de las DC humanas en presencia y ausencia de subconjuntos de células T seleccionadas. Los autores de la presente invención controlarán los marcadores de la superficie celular tales como CD80 para determinar la maduración de las DC y la secreción de IFN γ para determinar la inducción de respuestas Th1. Si se detecta evidencia de IR, se aislarán subconjuntos de CD4 y CD8 y se someterán a ensayo para determinar la citotoxicidad y la especificidad anti-leucemia.

Referencias (Excepto Ejemplos 4-6)

1. Guilhot, F., Roy, L., Guilhot, J., y Millot, F. (2004). Interferon therapy in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 18: 585-603, viii.
2. Pyrhonen, S. O. (2004). Systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Scand J Surg* 93: 156-161.
3. Nemunaitis, J. (2003). GVAX (GMCSF gene modified tumor vaccine) in advanced stage non small cell lung cancer. *J Control Release* 91: 225-231.
4. Portielje, J. E., Gratama, J. W., van Ojik, H. H., Stoter, G., y Kruit, W. H. (2003). IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 52: 133-144.
5. Sasiain, M. C., et al. (1998). Interferon-gamma (IFN-gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) are necessary in the early stages of induction of CD4 and CD8 cytotoxic T cells by Mycobacterium leprae heat shock protein (hsp) 65 kD. *Clinical and experimental immunology* 114: 196-203.
6. Portielje, J. E., et al. (2003). Repeated administrations of interleukin (IL)-12 are associated with persistently elevated plasma levels of IL-10 and declining IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-8 responses. *Clin Cancer Res* 9: 76-83.
7. Sacco, S., et al. (1997). Protective effect of a single interleukin-12 (IL-12) predose against the toxicity of subsequent chronic IL-12 in mice: role of cytokines and glucocorticoids. *Blood* 90: 4473-4479.
8. Leonard, J. P., et al. (1997). Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 90: 2541-2548.
9. Masztalerz, A., Van Rooijen, N., Den Otter, W., y Everse, L. A. (2003). Mechanisms of macrophage cytotoxicity in IL-2 and IL-12 mediated tumour regression. *Cancer Immunol Immunother* 52: 235-242.
10. Zagozdzon, R., et al. (1998). Effective chemo-immunotherapy of L1210 leukemia in vivo using interleukin-12 combined with doxorubicin but not with cyclophosphamide, paclitaxel or cisplatin. *Int J Cancer* 77: 720-727.
11. Tatsumi, T., et al. (2001). Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 61: 7563-7567.
12. Nastala, C. L., et al. (1994). Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol* 153: 1697-1706.
13. Dunussi-Joannopoulos, K., Runyon, K., Erickson, J., Schaub, R. G., Hawley, R. G., y Leonard, J. P. (1999). Vaccines with interleukin-12-transduced acute myeloid leukemia cells elicit very potent therapeutic and long-lasting protective immunity. *Blood* 94: 4263-4273.
14. Atkins, M. B., et al. (1997). Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 3: 409-417.
15. Kang, W. K., et al. (2001). Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Human gene therapy* 12: 671-684.
16. Mazzolini, G., et al. (2005). Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *J Clin Oncol* 23: 999-1010.
17. Dohnal, A. M., Witt, V., Hugel, H., Holter, W., Gadner, H., y Felzmann, T. (2007). Phase I study of tumor Ag-loaded IL-12 secreting semi-mature DC for the treatment of pediatric cancer. *Cytotherapy* 9: 755-770.
18. Gollob, J. A., et al. (2000). Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. *Clin Cancer Res* 6: 1678-1692.
19. Coughlin, C. M., Wysocka, M., Trinchieri, G., y Lee, W. M. (1997). The effect of interleukin 12 desensitization on the antitumor efficacy of recombinant interleukin 12. *Cancer research* 57: 2460-2467.
20. Asselin-Paturel, C., et al. (2001). Differential effect of high doses versus low doses of interleukin-12 on the adoptive transfer of human specific cytotoxic T lymphocyte in autologous lung tumors engrafted into severe combined immunodeficiency disease-nonobese diabetic mice: relation with interleukin-10 induction. *Cancer* 91: 113-122.
21. Saudemont, A., et al. (2002). Gene transfer of CD 154 and IL 12 cDNA induces an anti-leukemic immunity in a murine model of acute leukemia. *Leukemia* 16: 1637-1644.
22. Tahara, H., et al. (1994). Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma in vivo. *Cancer research* 54: 182-189.

23. Tahara, H., et al. (1995). Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. *J Immunol* 154: 6466-6474.
24. Zitvogel, L., et al. (1995). Cancer immunotherapy of established tumors with IL-12. Effective delivery by genetically engineered fibroblasts. *J Immunol* 155: 1393-1403.
- 5 25. Gambotto, A., et al. (1999). Induction of antitumor immunity by direct intratumoral injection of a recombinant adenovirus vector expressing interleukin-12. *Cancer gene therapy* 6: 45-53.
26. Tatsumi, T., et al. (2007). Injection of IL-12 gene-transduced dendritic cells into mouse liver tumor lesions activates both innate and acquired immunity. *Gene therapy* 14: 863-871.
- 10 27. Barker, S. E., et al. (2007). Immunotherapy for neuroblastoma using syngeneic fibroblasts transfected with IL-2 and IL-12. *British journal of cancer* 97: 210-217.
28. Paige, C. J., Kincade, P. W., y Ralph, P. (1978). Murine B cell leukemia line with inducible surface immunoglobulin expression. *J Immunol* 121: 641-647.
29. Yoshimitsu, M., et al. (2004). Bioluminescent imaging of a marking transgene and correction of Fabry mice by neonatal injection of recombinant lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16909-16914.
- 15 30. Dull, T., et al. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72: 8463-8471.
31. Silvertown, J. D., Walia, J. S., Summerlee, A. J., y Medin, J. A. (2006). Functional expression of mouse relaxin and mouse relaxin-3 in the lung from an Ebola virus glycoprotein-pseudotyped lentivirus via tracheal delivery. *Endocrinology* 147: 3797-3808.
- 20 32. Wilson, S. D., McCay, J. A., Butterworth, L. F., Munson, A. E., y White, K. L., Jr. (2001). Correlation of suppressed natural killer cell activity with altered host resistance models in B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 177: 208-218.
33. Alli, R. S., y Khar, A. (2004). Interleukin-12 secreted by mature dendritic cells mediates activation of NK cell function. *FEBS Lett* 559: 71-76.
- 25 34. Redlinger, R. E., Jr., Shimizu, T., Remy, T., Alber, S., Watkins, S. C., y Barksdale, E. M., Jr. (2003). Cellular mechanisms of interleukin-12-mediated neuroblastoma regression. *J Pediatr Surg* 38: 199-204.
- 35 35. Alatrash, G., et al. (2004). Clinical and immunologic effects of subcutaneously administered interleukin-12 and interferon alfa-2b: phase I trial of patients with metastatic renal cell carcinoma or malignant melanoma. *J Clin Oncol* 22: 2891-2900.
- 30 36. Blachere, N. E., et al. (2006). IL-2 is required for the activation of memory CD8+ T cells via antigen cross-presentation. *J Immunol* 176: 7288-7300.
37. Coughlin, C. M., et al. (1998). Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 101: 1441-1452.
38. Robertson, M. J., et al. (2006). Clinical and biological effects of recombinant human interleukin-18 administered by intravenous infusion to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 12: 4265-4273.
- 35 39. Labbe, A., Tran, A. H., y Paige, C. J. (2006). Murine model of immune-mediated rejection of the acute lymphoblastic leukemia 70Z/3. *J Immunol* 176: 5354-5361.
- 40 40. Zajac, A. J., Quinn, D. G., Cohen, P. L., y Frelinger, J. A. (1996). Fas-dependent CD4+ cytotoxic T-cell-mediated pathogenesis during virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14730-14735.
41. Matsushita, M., et al. (2006). Possible involvement of allogeneic antigens recognised by donor-derived CD4 cytotoxic T cells in selective GVL effects after stem cell transplantation of patients with haematological malignancy. *Br J Haematol* 132: 56-65.
42. Corthay, A., et al. (2005). Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity* 22: 371-383.
- 45 43. Hombach, A., Kohler, H., Rappl, G., y Abken, H. (2006). Human CD4+ T cells lyse target cells via granzyme/perforin upon circumvention of MHC class II restriction by an antibody-like immunoreceptor. *J Immunol* 177: 5668-5675.
44. Zhang, Y., et al. (2007). Th1 cell adjuvant therapy combined with tumor vaccination: a novel strategy for promoting CTL responses while avoiding the accumulation of Tregs. *International immunology* 19: 151-161.
- 50 45. Perez-Diez, A., et al. (2007). CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*.
46. Chung, Y., Qin, H., Kang, C. Y., Kim, S., Kwak, L. W., y Dong, C. (2007). An NKT-mediated autologous vaccine generates CD4 T-cell dependent potent antilymphoma immunity. *Blood* 110: 2013-2019.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

5 pHR'.cPPT.EF.CD19 ΔTmkpF105YR200A.WPRE.SIN.
AATTACCTGTGGTTTCATTTACTCTAAACCTGTGATTCCCTCTGAATTATTTTCATTTTAAAGAAATTGT
ATTTGTTAAATATGTACTACAACTTAGTAGTTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAAAGAAGACAAGATAT
CCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTAGCAGAACTACACACCAGGGCCAGG
GGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGA
GGCCAATAAAGGAGAGAACCACAGCTTGTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAG
AGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATCAGTGGCCCGAGAGCTGCATCCCGA
GTACTTCAAGAAGTGTGATATCGAGCTTGTCTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGCG
TGGCCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTGCCTGTA
CTGGGCTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAAC TAGGGAACCCACTGCTTA
AGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGTCTCAAGTAGTGTGTGCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACT
AGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCCCGAACAGGGACTTGAA
AGCGAAAGGGAACCCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGTGAAGCGCGCACGGCAAGAGG
CGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTG
CGAGACCGCTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCCCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGG
AAAGAAAAAATATAAATTAACAATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACCATTTCGAGTTAATCC
TGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAAATCTCTGGGACAGCTACAACCATCCCTCAGACAGG
ATCAGAAGAAGTATAGATCATTTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGAT
AAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGGCAAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCA
AGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATATATAAAT
ATAAAGTAGTAAAAATGAACCATTAGGAGTAGCACCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAG
AAAAAAGAGCAGTGGGAATAGAGCTTTTGTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG
CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATT
TGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGG
CAAGAACTCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGGGGTTGCTCTGGAA
AACTCATTTGCACCCTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGA
ATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATG
AAGAATCGCAAAACAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGT
GGAATGGTTTAAACATAACAATTTGGCTGTGGTATATAAATTTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGG
TAGGTTTAAAGAATAGTTTTTGTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTAT
CGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAG
AGAGAGACAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGATTTTAAAGAAAAGGG
GGGATTTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA
TTACAAAACAAATTCAAAAATTCAAAATTTTATCGATAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTAA
CAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGCTTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGGCC
GTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCG
GTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAAGTGAATGTCGTGTACTGGCTCCGCTTTTTTCCCG
AGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCCGCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGGCC
CCAGAACACAGGTAAGTGCCTGTGTGGTTCCCGCGGCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGGC
TGCCCTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGT
GGGAGAGTTCGAGGCTTGGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGTGAGTTGAGGCTGGCCTGGGC
GCTGGGGCCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAAGTCTCTAG
CCATTTAAAATTTTGTATGACCTGTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTTGTAATGCGGGCC
AAGATCTGCACACTGGTATTTGGTTTTTGGGGCCCGGGCGGCGACGGGGCCGTGCGTCCAGCGCA
CATGTTCCGGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCGCCACCCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC
GGCCTGCTCTGGTGCCTGGCTCGCGCCCGGTGTATCGCCCGCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGT
CGGCACAGTTGCGTGAAGCGGAAAGATGGCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGA
CGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGCTCAGCCG
TCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTCTCGAGCTTTTGG
GTACGTCGCTTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGA
CTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGGAGTTGGATCTT
GGTTCATTTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAAGTGTCTGAGGAATTC
ATGCCACCTCCTCGCTCCTCTTCTTCTCCTCTTCTCACCCTCATGGAAGTCAAGCCCGAGGAACCT

CTAGTGGTGAAGGTGGAAGAGGGAGATAACGCTGTGCTGCAGTGCCTCAAGGGGACCTCAGATGGCCCC
 ACTCAGCAGCTGACCTGGTCTCGGGAGTCCCGCTTAAACCTTCTTAAACTCAGCCTGGGGCTGCCA
 GGCTTGGGAATCCACATGAGGGCCCTGGCATCCTGGCTTTTCATCTTCAACGTCTCTCAACAGATGGGG
 GGCTTCTACCTGTGCCAGCCGGGGCCCCCTCTGAGAAGCCCTGGCAGCCTGGCTGGACAGTCAATGTG
 GAGGGCAGCGGGGAGCTGTCCGGTGAATGTTTCGGACCTAGGTGGCCTGGGCTGTGGCCTGAAGAAC
 AGGTCCTCAGAGGGCCCCAGCTCCCCCTCCGGGAAGCTCATGAGCCCCAAGCTGTATGTGTGGGCCAAA
 GACCCGCTGAGATCTGGGAGGGAGAGCCTCCGTGTGCCACCGAGGGACAGCCTGAACCAGAGCCTC
 AGCCAGGACCTCACCATGGCCCCCTGGCTCCACACTCTGGCTGTCTGTGGGGTACCCCCCTGACTCTGTG
 TCCAGGGGCCCTCTCTTGACCCATGTGCACCCCAAGGGCCCTAAGTCAATTGCTGAGCCTAGAGCTG
 AAGGACGATCGCCCGCCAGAGATATGTGGTAATGGAGACGGGTCTGTGTTGCCCGGGCCACAGCT
 CAAGACGCTGGAAGTATTATGTACCCGTGGCAACCTGACCATGTCAATCCACCTGGAGATCACTGCT
 CGGCCAGTACTATGGCACTGGCTGTGAGGACTGGTGGCTGGAAGGTCTCAGCTGTGACTTTGGCTTAT
 CTGATCTTCTGCCGTGTGTCCCTGTGGGCATTCATCCTTGCCGGGGGGCTGCAGGGATGGCGGCC
 CGGCGGGGGCTCTCATAGTGTGGAGGGCTGGACCCGCGCGGAAGAGCACGCAGAGCCGCAAGCTG
 GTGGAAGCGCTGTGCGCCGGGGCCACCGCGCCGAACTGCTCCGGTTCCCGGAAAGATCAACTGAAATC
 GGCAACTTCTGAGTCTCTACTTGCAAAAGAAAAGTGACGTGGAGGATCACTCGGTGCACCTGCTTTTT
 TCTGCAATCGCTGGGAACAGTCCCGTAAATTAAGGAAAAGTTGAGCCAGGGCGTGACCCCTCGTCTGTG
 GACAGATACGCATTTCTGGTGTGGCCTACACAGGTGCCAAGGAGAATTTTTCCCTAGACTGGTGAAA
 CAGCCAGACGTGGGCCCTCCCAAACCCGACCTGGTCCCTGTCTCCAGTTACAGCTGGCGGATGCTGCC
 AAGCGGGGAGCGTTGGCCATGAGCGCTATGAGAACGGGGCTTCCAGGAGCGGGCGCTCCGGTGTTC
 CACCAGCTCATGAAAGACACGACTTTGAACTGGAAGATGGTGGATGCTTCCAAAAGCATCGAAGCTGTC
 CATGAGGACATCCCGGTGCTCTCTGAGGACGCCATCGCCACTGCCACAGAGAAGCCCTGGGGGAGCTA
 TGAAGTGAGGATCCAAGCTTCAATTGGTCACTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAA
 AGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG
 TATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTTT
 TATGAGGAGTTGTGGCCCGTGTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACCTGTGTTGCTGACGCAACCC
 ACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCC
 ACGCCGGAACCTACGCGCCCTGCCTTGCCCGCTGTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAAT
 TCCGTGGTGTGTGCGGGAAGCTGACGCTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTG
 CGGGGACGCTCCTTCTGCTACGCTCCCTTCCGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCTGCTG
 CCGGCTGTGCGGCTCTTCCCGGTCTTCCGCTTCCGCCCTCAGACGAGTCCGATCTCCCTTTGGCCGCC
 TCCCGCCTGTCTGAGACCTAGAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCT
 GATTGTGCTGGCTAGAAGCACAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCAGTACACCTCAGGTACTCTTA
 AGACCAATGACTTACAAGGACGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTTAAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGG
 CTAATCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTGTGTTGACTGGGTCTCTCTGTTAGACCAGATC
 TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTGAGTG
 CTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC TAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCA
 GTGTGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTAGTATTTATAACTTGCAAGAAA
 TGAATATCAGAGAGTGAGAGGCCCTGACATTATAATAGATTTAGCAGGAATTGAAC TAGGAGTGGAGCA
 CACAGGCAAGCTCGAGAAGTACTTGGAGAAGCCACCAGAGATACTCAGGATCTGCACATACCTGGC
 TAATCCAGATCCTAAGGATTACATTAAGTTTACTAACATTTATATAATGATTTATAGTTTAAAGTATA
 AACTTATCTAATTTACTATTCTGACAGATATTAATTAATCCTCAAATATCATAAGAGATGATTACTATT
 ATCCCATTTAACACAAGAGGAAACTGAGAGGGAAAGATGTTGAAGTAATTTTCCACAATTACAGCAT
 CCGTTAGTTACGACTCTATGATCTTCTGACACAAATCCATTTACTCCTCACCCCTATGACTCAGTCGAA
 TATATCAAAGTTATGGACATTATGCTAAGTAACAAATACCCTTTTATATAGTAAATACTGAGTAGATT
 GAGAGAAGAAATGTTTGCAACCTGAATAGCTTCAAGAAGAAGAGAAGTGAGGATAAGAATAACAGTT
 GTCATTTAACAAAGTTTAAACAGTAACCTGGTTAGAAAGGGATTCAAATGCATAAAGCAAGGGATAAAT
 TTTTCTGGCAACAAGACTATACAATATAACCTTAAATATGACTTCAAATAAATGTTGGAACCTTGATAAA
 ACTAATTAATATATTGAAGATTATCAATATATAAATGTAATTTACTTTTAAAAGGGAACATAGAA
 ATGTGTATCATTAGAGTAGAAAACAATCCTTATTATCACAAATTTGTCAAACAAGTTTGTATTAAACAC
 AAGTAGAATACTGCATTCAATTAAGTTGACTGCAGATTTGTGTTTTGTTAAAATTAGAAAGAGATAAC
 AACAATTTGAATTTATGAAAGTAACATGTAATAGTTCTACATACGTTCTTTTGACATCTTGTTCATC
 ATTGATCGAAGTTCTTTATCTTGAAGAATTTGTTCCAAAGACTCTGAAAATAAGGAAAACAATCTATTA
 TATAGTCTCACACCTTTGTTTTACTTTTTAGTGATTTCAATTTAATAATGTAATGTTAAAATTTATTC
 TTCTCTGAGATCATTTACATTGCAGATAGAAAACCTGAGACTGGGGTAATTTTTATTAATAATCTAATT
 TAATCTCAGAAACACATCTTTATCTAACATCAATTTTCCAGTTTGATATTATCATATAAAGTCAGCC
 TTCTCTATCTGCAAGTTCCACAACAAAATCCAACCACTGTGGATCAAAAATATTGGGAAAAAATTA
 AAATAGCAATACAACAATAAAAAATACAATCAGAAAACAGCACAGTATAACAACCTTTATTTAGCAT
 TTACAATCTATTAGGTATTATAAGTAATCTAGAATTAATCCGTGTATTCTATAGTGTACCTAATCG
 TATGTGTATGATACATAAGGTTATGTATTAATTTAGCCGCTTCTAACGACAATATGTACAAGCCATA

TTGTGTAGCATCTGGCTTACTGAAGCAGACCCTATCATCTCTCTCGTAAACTGCCGTCAGAGTCGGTTT
GGTTGGACGAACCTTCTGAGTTTCTGGTAAACGCCGTCCCAGCACCAGAAATGGTCAGCGAACCAATCAG
CAGGGTCATCGCTAGCCAGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCCACAGGTGC
GGTTGCTGGCCCTATATCGCCGACATCACCAGTGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAG
CGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTGGGCGCCATCTCCTTGCA
TGCACCATTCTTGGCGGGCGGTGCTCAACGGCTCAACCTACTACTGGGCTGCTCCTAATGCAGGA
GTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCC
AGCCCCGACACCAGCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACA
GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGA
GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGT
CAGGTGGCACTTTTGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATA
TGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAGATGAGTA
TTCAACATTTCCGCTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCCACCAG
AAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACGGATC
TCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGAAGAACGTTTCCAAATGATGAGCACTTTAAAG
TTCTGTATGTGGCGCGGTATATCCGCTATTGAGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACT
ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA
GAGAAATATGACAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCG
GAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGG
AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAA
CGTTGGCAAACATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGG
AGGGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATGCTGATAAAT
CTGGAGCCGCTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGACGACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTA
TCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAACTATGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAG
GTGCCCTACTGATTAAGCATTGGTAACGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAA
AACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAAATCTCATGACCAAAATCCCTT
AACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTT
TTTTTCTGCGCGTAATCTGTCTGCTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGGCCG
ATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTACGACAGCGCAGATACCAAAATACTGTTC
TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGC
TAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGAT
AGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAA
CGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA
AGGGGACAGGTATCCGGTAAAGCGGCGAGGTGGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAA
ACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCT
CGTCAAGGGGGCGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCT
GGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTG
AGTGACCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGGAGTCAAGTGAAGCGGAAAGCGGAA
AGCGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCTAATGCAGCTGTGGAATGTGTG
TCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTA
GTCAGCAACAGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAA
TTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCCGCCATCCCGCCCTAATCCCGCCAGTTCCGCCCA
TTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCGGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCT
ATTCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAGCTTGGACACAAGACAGG
CTTGGCAGATATGTTTGAATAACACTTTATCCCGCGTCAGGGAGAGGAGTGCCTAAAAAGACGCGG
ACTCATGTGAAACTGTTTFTAGTGCAGCAGATCTCTATAATCTCGCGCAACCTATTTTCCCTCGA
ACACTTTTTAAGCGTAGATAAAACAGGCTGGGACACTTACATGAGCGAAAAATACATCGTACCTGGG
ACATGTTGCAGATCCATGCACGTAACCTCGCAAGCCGACTGATGCCTTCTGAACAATGAAAGGCATTA
TTGCCGTAAGCCGTGGCGGTCTGTACCGGGTGCCTTACTGGCGGTGAATGGGTATTCGTGATGTCGA
TACCGTTGATTTCCAGCTACGATCAGCAACAGCGCGAGCTTAAAGTGTGAAACGCGCAGAAGG
CGATGGCGAAGGCTTATCGTTATTGATGACCTGGTGGATAACCGTGGTACTGCGGTTGCGATTCGTGA
AATGTATCCAAAAGCGCACTTTGTACCATCTTCCGCAAAACCGGCTGGTCTCGCTGGTTGATGACTA
TGTTGTTGATATCCCGCAAGATACCTGGATTGAACAGCCGTGGGATATGGGCGTCTGATTCGTCCCGC
AATCTCCGGTGCCTAATCTTTTCAACGCTGGCACTGCCGGCGTGTCTTTTTTAACTTCCAGCGGGT
TACAATAGTTTCCAGTAAGTATCTGGAGGCTGCATCCATGACACAGGCAAACTGAGCGAAACCTGT
TCAAACCCCGCTTAAACATCCTGAAACCTCGACCTAGTCCCGCTTAAATCACGGCGCACAAACCGC
CTGTGAGTCCGGCCTTGTGTTAAACCATCCCTCACTGGTATCGCATGATTAACCGTCTGATGTGGA
TCTGGCGCGCATGACCCACGCAAACTCTCGACGTCCAGGCAGTATTGTGATGAGCGATGCCGAAC
GTACCGACGATGATTTATACGATACGGTATTGGTACCGTGGCGCAACTGGATTATGAGTGGGCC
CGGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAACTACCTACAGAGATTTAA

AGCTCTAAGGTAATATAAAAATTTTAAAGTGATAATGTGTTAAACTACTGATTCTAATTTGTTGTGTA
TTTTAGATTCCAACCTATGGAAGCTGATGAATGGGAGCAGTGGTGAATGCCTTTAATGAGGAAAACCTG
TTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTTACTCCCTCCA
AAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCT
GTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAGCTGCACTGCTATAC
AAGAAAATTATGAAAAATATCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTG
TTTTTTCTTACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTTGTGTACCTTT
AGCTTTTTAATTTGTAAGGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCCTGACTAGAGATCATAAT
CAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAA
ACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTAACTTTGTTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAGCAA
TAGCATCACAAATTTACAAAATAAGCATTTTTTTCATGCTTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCAT
CAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAACTGGATAACTCAAGCTAACCAAAATCATCCAAACTTCCCAC
CCCATACCCCTATTACCCTGCT

Cadena principal pHR

AATTACCTGTGGTTTCATTTACTCTAAACCTGTGATTCTCTGAATTATTTTCATTTTAAAGAAATTGT
ATTTGTTAAATATGACTACAACCTTAGTAGTTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAAAGAACAGATAT
CCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTAGCAGAATAACACACCAGGGCCAGG
GGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTACTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGA
GGCCAAATAAGGAGAGAACCAGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAG
AGAAGTGTAGAGTGGAGTTTGACAGCCGCTAGCATTTCATCAGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGA
GTACTTCAAGAATCTGTGATATCGAGCTTGTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGCG
TGGCTGGGGCGGACTGGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCTGT
CTGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAAGTGGGAACCCACTGCTTA
AGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTGTGACTCTGGTAACT
AGAGATCCCTCAGACCTTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCGAACAGGGACTTGAA
AGCGAAAGGGAAACAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGTGTAAGCGCCAGGGCAAGAGG
CGAGGGCGGCGACTGGTGTAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTG
CGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGG
AAAGAAAAAATATAAATTAACAATATAGTATGGGCAGCAGGAGCTAGAAGCATTCCAGTTAATCC
TGGCTGTTAGAACATCAGAAGGCTGTAGACAAACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGG
ATCAGAAAGAACTTAGATCATTTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGAT
AAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAGTAAGACCACGCACAGCA
AGCGGCGCTGATCTTTCAGACTGGAGGAGGATATGAGGGCAATTTGGAGAAGTGAATTATATAAAT
ATAAAGTAGTAAATTAACCATTAGGAGTAGCACCACCAAGCAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAG
AAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG
CAGCGTCAATGACCTGACGCTACAGGCGAGACAATTTATTGCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAT
TGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGG
CAAGAAATCCTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAA
AACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCCTTGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGA
ATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTG
AAGAAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTTTGAATTAGATAAATGGCAAGTTTGT
GGAATTGGTTTAAACATAACAATTTGGCTGTGGTATATAAATTTATCATAATGATAGTAGGAGGCTTGG
TAGGTTTAAAGAATAGTTTTTGTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGATATTCACCATTAT
CGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGACCCGACAGGCCCAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAG
AGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGATTTTAAAGAAAAGGG
GGGATTTGGGGGCTACAGTGCAGGGCAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA
TTACAAAAACAATTAACAAAAATCAAAATTTTATCGATAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAA
CAGAGAGGAATCTTTGACGCTAATGGACCTTCTAGTCTTGAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCC
GTCAGTGGGCGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCG
GTGCC TAGAGAAGTGGCGCGGGGTAAC TGGGAAAGT GATGTCGTGTACTGGCTCCGCTTTTTCCCG
AGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCCGCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCG
CCAGAACACAGGTAAGTGCCTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCG
TGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATCTTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGT
GGGAGGTTTCGAGGCTTTCGCTTAAGGAGCCCTTCGCTCGTCTGCTTGGTTGAGTTGAGGCTGGCCCTGGG
GCTGGGGCCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAG
CCATTTAAAATTTTGGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCC

AAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGGGGCCGGGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCA
 CATGTTCCGGCGAGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC
 GGCTGCTCTGGTGCCTGGCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGT
 CGGCACAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGA
 CGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGTAGTCAACCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCG
 TCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCGAGCTTTTGGA
 GTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGA
 CTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTCTGGAAATTTGCCCTTTTGTAGTTTGGATCTT
 GGTTCATTTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCATTTAGGTTGCTGTGAG
 AATTACCTGTGGTTTCATTTACTCTAAACCTGTGATTCTCTGAATTATTTTCATTTTAAAGAAATTGT
 ATTTGTTAAATATGTAATACTTACTTAACTTAGTAGTTGGAAGGGCTAATTCACCTCCAAAGAAGACAAGATAT
 CCTTGATCTGTGGATCTACACACACAAAGGCTACTTCCCTGATTAGCAGAACTACACACCAGGGCCAGG
 GGTACAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGA
 GGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAG
 AGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGA
 GTACTTCAAGAAGTGTGATATCGAGCTTGCTACAAGGGACTTCCCGTGGGGACTTCCAGGGAGGCG
 TGGCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCTGTA
 CTGGGCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTA
 AGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGTCTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACT
 AGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCACTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAA
 AGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGTGTAAGCGGCACGGCAAGAGG
 CGAGGGGCGGGCTGGTGTAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTG
 CGAGAGCGTCACTATTAAGCGGGGAGAAATAGATCGGATGGGAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGG
 AAAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCC
 TGGCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAACTGAGGACAGCTACAACCATCCCTCAGACAGG
 ATCAGAGAAGTATGATCATATATAATACAGTAGCAACCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGAT
 AAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCA
 AGCGGCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAAT
 ATAAAGTAGTAAAATTTGAACCATTAGGAGTAGCACCACCAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAG
 AAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG
 CAGCCTCAATGACCTGACGCTACAGGCCAGACAATTATTGCTGGTATAGTGCAGCAGCAGACAATT
 TGCTGAGGGCTATTGAGGGCGAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGG
 CAAGAACTCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAA
 AACTCATTTGCACCCTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGA
 ATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTG
 AAGAATCGCAAAACAGCAAGAAAAGAAATGAACAAGAATTAATGGAAATAGATAAATGGGCAAGTTTGT
 GGAATTTGTTAACAATAAATTTGGCTGTGGTATATAAATTAATCATAATGATAGTAGGAGGCTTGG
 TAGGTTAAGAATAGTTTTTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTAT
 CGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGTGGAG
 AGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGATTTTAAAAGAAAAGG
 GGGATTTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA
 TTACAAAAACAAATTAACAAAAATCAAAATTTTATCGATAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTAAA
 CAGAGAGGAATCTTTGACGCTAATGGACCTTCTAGGCTTTGAAAGGAGTGGGAATTTGGCTCCGGTGCC
 GTCAGTGGGCGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTGGGGGAGGGTCCGCAATTGAACCG
 GTGCCATAGAGAAGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAGTGTGCTGCTGACTGGCTCCGCTTTTCCCG
 AGGGTGGGGGAGAACCATATAAGTGCAGTAGTCCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCCG
 CCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTTTTACGGTTATGGCCCTTGGC
 TGCTTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCCGGTTGGAAGTGGGT
 GGGAGAGTTGAGGCTTGGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGTGTTAGTTGAGGCTGGCCGGGC
 GCTGGGCGCCCGGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAG
 CCATTTAAAATTTTGTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCC
 AAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGGGGCCGGGACGGGGCCCGTCCGTCCAGCGCA
 CATGTTCCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGGGCCACCAGAAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC
 GGCCTGCTCTGGTGCCTGGCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGT
 CGGCACAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGA
 CGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGTAGTCAACCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCG
 TCGCTTATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCCTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGA
 GTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGA
 CTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTCTGGAAATTTGCCCTTTTGTAGTTTGGATCTT
 GGTTCATTTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCATTTAGGTTGCTGTGAGGAATTC

GGATCCAAGCTTCAATTGTGGTCACTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACT
GGTATTCCTTAACATAGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAAATGCCCTTGTATCATGCT
ATTGCTTCCCCTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAG
TTGTGGCCCGTTGTGAGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTCTGACGCAACCCCACTGGTTGG
GGCATTGCCACCCTGTGACCTCCTTTCCGGACTTTTCGCTTTCCTCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAA
CTCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCCGTGGTG
TTGTCCGGGAAGCTGACGCTCCTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTGCCACTGGATTCTGCGCGGGACG
TCCTTCTGTACGCTCCTTCCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGGGCTGCTGCGCGGCTGTG
CGGCTTCCCGGCTTTCGCTTCCGCTCAGACGAGTCCGATCCTCCTTGGGGCGCTCCCGCCT
GCTCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCC
TGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGTGGGTTTTCCAGTACACCTCAGGTACCTTAAAGACCAATG
ACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCAC
TCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGG
GAGCTCTCTGGCTAATAGGAAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCTTGGAGTGTCTCAAGTA
GTGTGTGCCGCTGTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAA
ATCTCTAGCAGTAGTAGTTTATGTATCTTATTATTCAGTATTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCA
GAGAGTGAGAGGCTTGACATATAATAGATTTAGCAGGAATGAACTAGGAGTGGAGCACACAGGCAA
AGCTGCAGAAGTACTTGGAAAGCCACCAGAGATACTCAGGATCTGCACATACCTGGCTAATCCCGAG
ATCCTAAGGATTACATTAAGTTACTAACATTTATATAATGATTTATAGTTTAAAGTATAAACTTATCT
AATTTACTATTCGACAGATATAATTAATCCTCAAATATCATAAGAGATGATTACTATTATCCCCATT
TAACACAAGAGGAACTGAGAGGAAAGATGTTGAAGTAATTTCCACAAATACAGCATCCGTTAGTT
ACGACTCTATGATCTTCTGACACAAATCCATTTACTCCTCACCTATGACTCAGTCGAATATATCAAA
GTTATGGACATTAAGTAAACAAATFACCTTTTATATAGTAAATACTGAGTAGATTGAGAGAAGA
AATGTTTTGCAAACTGAATAGCTTCAAGAAGAAGAGAAAGTGGGATAAGAATAACAGTTGTCAATTTAA
CAAGTTTTAACAAGTAACTTGGTTAGAAAGGATTCAAATGCATAAAGCAAGGGATAAATTTTTCTGGC
AACAAGACTATACAATATAACCTTAAATATGACTTCAAATAATGTTGGAACTTGATAAAACTAATTA
ATATTATGAAGATTATCAATATATAAATGTAATTTACTTTTTAAAAGGGAAACATAGAAATGTGTATC
ATTAGAGTAGAAAACAATCCTTATTATCACAATTTGTCAAACAAGTTTGTATTAAACACAAGTAGAAT
ACTGCATTCAATTAAGTTGACTGCAGATTTTGTGTTTTGTTAAAATTAGAAAAGAGATAACAACAATTTG
AATTTATGAAGTAACATGTAATAGTTCTACATACGTTCTTTTACATCTTGTTCATCATGATCGA
AGTTCTTTATCTTGAAGAATTTGTTCCAAAGACTCTGAAATAAGGAAAACAATCTATTATATAGTCTC
ACACCTTTGTTTTACTTTTAGTGATTTCAATTTAATAATGTAATGGTTAAAATTTATCTTCTCTGAG
ATCATTTACATTTGCAGATAGAAAACCTGAGACTGGGGTAAATTTTATTTAAAATCTAATTTAATCTCAG
AAACACATCTTTATTTCAACATCAATTTTCCAGTTTGTATTTATCATATAAAGTCAGCCTTCTCATC
TGCAGGTTCCACAAACAAAATCCAACCACTGTGGATCAAAAATATTGGGAAAAAATAAAAATAGCAA
TACAACAATAAAAAATACAATCAGAAAAACAGCACAGTATAACAACCTTATTTAGCATTTACAATCT
ATTAGGTATTATAAGTAATCTAGAATTAATCCGTGTATTCTATAGTGTACCTAAATCGTATGTGTAT
GATACATAAAGTTATGTATTAATTTAGTCCCGCTTCTAACGACAATATGTACAAGCCTAATTTGTGATG
ATCTGGCTTACTGAAGCAGACCCTATCATCTCTCTCGTAAACTGCCGTGAGTCCGTTTGGTTGGACG
AACCCTCTGAGTTTCTGGTAAACGCGTCCCGCACCCGAAATGGTCAGCGAACCAATCAGCAGGGTCAT
CGCTAGCCAGATCCTCTACGCCGAGCATCGTGGCCGCAACCCGGCCACAGGTGCGGTTGCTGG
CGCTATATCGCCGACATCACCGATGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGT
CGGCTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATT
CCTTGGCGGGCGGTGCTCAACGGCCTAACCTACTACTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTCGCATAA
GGGAGAGCGTCAATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCGAC
ACCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTG
TGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGTTTTACCCGTATCACCGAAACGCGGAGACGAAAG
GCCTCGTGATACGCCATTTTTTATAGGTTAATGTGATGATAAATGGTTTCTTAGACGTGAGGTGGCA
CTTTTCCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTTCAATATGTATCCGC
TCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGAGTATTCACATT
TCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGGGCAATTTGCTTCCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGG
TGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCG
GTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCGCTAT
GTGGCGCGGTATTTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGA
ATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
GCAGTGTGCCATAACCATGAGTATAACACTGCGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGA
AGGAGTAAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGC
TGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCA
AACTATTAACCTGCGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATA
AAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG

GTGAGCGTGGGTCTCGGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCAC
TGATTAAGCATTGGTAACGTGCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATT
TTTAAATTTAAAAGGATCTAGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGT
TTTCGTTCACCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGC
GCGTAATCTGCTGCTTGCACAAAACAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGC
TACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGT
AGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGT
TACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGG
ATAAGGCGCAGCGGTTCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACA
CCGAACCTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGGGACA
GGTATCCGGTAAGGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGT
ATCTTTATAGTCTGTTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
GGCGGAGCCTATGAAAACGCCAGCACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTG
CTCACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTG
ATACCCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGAGGAAAGCGGAAAGCGCCAA
TACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTGGCCGATTCAATTAATGAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGG
GTGTGAAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGCAGCGAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAAC
CAGGTGTGAAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGCAGCGAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGC
AACCATAGTCCCGCCCTAACCTCCGCCCTTCCCGCCCTAACCTCCGCCAGTTCGCCCATTTCCCGCC
CCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGGCGAGGCGCCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAA
GTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTTGGACACAAGACAGGCTTGGGAGA
TATGTTTGAGAAATACCCTTTATCCCGCTCAGGGAGAGGCAGTGGCTAAAAGACCGCGACTCATGTG
AAATACTGGTTTTTAGTGGCCAGATCTCTATAATCTCGCGCAACCTATTTTTCCCTCGAACACTTTTT
AAGCCGTAGATAAACAGCTGGGACACTTCACATGAGCGAAAATACATCGTCACTGGGACATGTTGC
AGATCCATGCACGTAACCTCGCAAGCCGACTGATGCCTTCTGAACAATGGAAGGCATTATTGCCGTAA
GCCGTGGCGGTCTGTACCGGGTGCCTTACTGGCGGTGAACCTGGTATTGCTCATGTGATACCGGTTG
TATTTCCAGCTACGATCAGCAACACGCGGAGCTTAAAGTGTGAAACGCGCAGAAAGCGGATGGCGA
AGGCTTCATCGTTATTGATGACCTGGTGGATACCGGTGGTACTGCGGTTGCCGATTGCTGAAATGTATCC
AAAAGCGCACTTTGTCACTTCTTCGCAAAAACCGGCTGGTTCGTCGCTGGTGTGATGACTATGTTGTGA
TATCCCGCAAGATACCTGGATTGAACAGCCGTGGGATATGGGCGTCTGATTCGTCGCCCAATCTCCGG
TCGCTAATCTTTTCAACGCCTGGCAGTCCCGGGCGTGTCTTTTAACTTACGGCGGTTACAATAGT
TTCCAGTAAGTATCTGGAGGCTGCATCCATGACACAGGCAACCTGAGCGAAAACCTGTTCAAACCC
GCTTTAAACATCCTGAAACCTCGACGCTAGTCCCGCCTTTAATCACGGCGCACAAACCGCTGTGCAGT
CGGCCCTGATGGTAAAACCATCCCTCACTGGTATCGCATGATTAACCGTCTGATGTGGATCTGGCGCG
GCATTGACCCACGCAAACTCTCGACGCTCAGGCACGATTTGTGATGAGCGATGCCGAACGTACCGACG
ATGATTTATACGATACGGTATTGGCTACCGTGGCGCAACTGGATTTATGAGTGGGCCCGGATCTTT
GTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAG
GTAATATAAAAATTTTAAAGTGTATAATGTGTTAACTACTGATCTAATGTTTGTGATTTTAGATT
CCAACCTATGGAACCTGATGAATGGGAGCAGTGGTGAATGCCCTTAAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCA
GAAGAAATGCCATCTAGTGTGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATCTACTCCTCCAAAAAAGAAG
AGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCTTTCAGAAATGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGT
AATAGAACTCTTGCTTGTCTTATTTACACCACAAAGGAAAAGCTGCACTGCTATACAAGAAAAT
ATGGAATAATTTCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTCTT
ACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTTGTACCTTTAGCTTTTAA
ATTTGTAAGGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTACTAGAGATCATAATCAGCCATAC
CACATTTGTAGAGGTTTTACTTGGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCGCTGAACCTGAAACATAAAAT
GAATGCAATTTGTTGTTAACTTGTATTTATGAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCAC
AAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATC
TTATCATGCTGGATCAACTGGATAACTCAAGCTAACCAAAATCATCCCAAACCTCCACCCCATACCC
TATTACCCTGCC

SEQ ID NO: 2 sec cPPT

ttttaaaaga aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag
tagacataat 60

agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaatt acaaaaattc
5 aaaattht 118

SEQ ID NO: 3

Virus de la Hepatitis de Marmota wpre

ES 2 654 303 T3

```

aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa
ctatgttgct      60

ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat
tgcttcccgt      120

atggcctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta
tgaggagtgt      180

tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcaactgtgt ttgctgacgc
aacccccact      240

ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt
ccccctccct      300

attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgtc gctggacagg
ggctcggctg      360

ttgggcactg acaattccgt ggtgttgtcg gggaagctga cgtcctttcc
atggctgctc      420

gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgtccttct gctacgtccc
ttcggccctc      480

aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct
tccgcgtctt      540

cgccctcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttggggccg cctccccgcc tg
592

```

5 **SEQ ID NO: 4**

Secuencia de pORF-hIL-12 (5048 pb).
 Marco de lectura abierto de hIL-12 en **negrita**.
 El conector de elastina está subrayado.

10 GGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGA
 GGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGC
 TCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACG
 GGTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAG

gtaagtgatactactagattatcaaaaagagtggtgactgtgagcgcctcaaatgatactagattcatcgagagggacacgctgactactaa
ccttctctcttctctacagctgagatcaccggccgaaggagggccaccatggggtcaccagcagttgggtcattcttgggtttt
ccctgggtttttctggccatctcccctcgtggccatctgggaaactgaaagaaagatgtttatgtcgtagaaattgga
ttggctatccggatgccctggagaaaatgggtggtcctcaccctgtgacaccccctgaaagaaagatggtatcacctg
gaccttggaccagagcagtgaggctttaggctctggcctgcaaaaaccctgaccatccaagtcaaaagagtttggag
atgctggccagtaaccctgtcacaaggaggcggaggttctaagccattcggctcctgctgcttcaaaaaag
gaagatggaatttgggtccactgataatttttaaaggaccagaagaaacccaaaaaaagaccctttctaagatgca
gagcccaagaaatttattctggaccgtttcacctgtcgggtggctgacgacaatcagtaactgatttggacattcagt
gtcaaaaagcagcagaggctcttctgaccccgaagggtgacgtgacggagctgctacactctctgacagagag
agtcagaggggacaacaaggagatgagtaactcagttgagtgccaggaggagacagtgccctgcccagctgctg
aggagagctgcccattgaggctatggtgagtgccgttcaagaactcaagatgaaaaactacaccagcagc
ttcttcatcagggacatcacaacctgaccccacaagaacttgcagctgaagccattaaagaattctccg
gcaggtggaggctcagctgggagtgacctgacacctggagtactccacattcctactttcctcctgacattctg
cgttcaggtccagggcaagagcaagagagaaaaagaaagatagagcttccacggacaagacctcagccaccg
gtcatctgcccgaaaaatgcccagcatttagcgtgcccggccaggaccgctactatagctcattcttggagcga
atgggcatctgtgcccctgacagtttctcggactagggggttacctgggggtggggccagaaaacctcccctggtg
ccactccagaccaggaatttcccatgcccctcaccactcccacaaactctgctgagggccgtcagcaaacatg
ctccagaaggccagcaaaactctagaattttacccttgcacttctgaaagagatgtagcatgaagatatacaca
aaagataaaaaccagcacaactggaggcctgtttaccatttgaattfaaccaagaatgagagttgacctaaattc
cagagagacctctttcacaactaattgggagttggcctggcctccagaaagacctcttttatgattggcccttgg
ccttagtagtattttatgaagactcgaagatgtaccaggtggagttcaagaccatgaatgcaaaagcttctgat
ggatccataagagggcagatctttctagatcaaaaactgctggcagttattgtagagctgtagcagggcccggaa
tttcaacagtgagactgtgcccaaaaactctcccctgaaagaaaccggattttttataaaaactaaaatcaagct
ctgcatacttctcattgctttcagaattcgggacagtgactattgtagagagtgatgagctatctgaaatgcttcc
taaaaagcgagggtcccctcaaacctgtgtcatttttataaaaactttgaaatgaggaactttgtagaggtgtgg
attaaagaaactagggaggggaaagaggtatgggactattacatccacatgatacctctgtagcaagatatttttga
catttactgtggataaaattgttttaagtttcatgaatgaatttgcataagaaggggggaattcttttgcctttta
ccctcagctagct

AGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCCGGTTGCTGGCGTTFITCCATAGGCTTCGCCCTGACGGA
GCATCACAAAATCGACCGTCAAGTCAGAGGTTGGGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTFCCCT
CTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCTCCCTTCGGGAA
GCGTGGCGTCTTCTCAATGCTCACGCTGFAAGGATCTCAGTTCGGTGTAGGTCCTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGT
GCAGCAACCCCGGTTACGCCGACCGCTGGCCCTTATCCGGTAACTAFCGCTTGAAGTCCAAACCGGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCTAGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGATATGAGGGCGTGTACAGAGTT
CTTGAAGTGTGGCTAACTACGCTACACTAGAAGAACAGTAATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTC
CTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTGTATCCGGCAACAACCCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAA
GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAGGAATCAAGAAGATCTTGTATCTTCTACGGGGTCTGACCGCTCAGT
GGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATTAACAAAAGGATCTTCACCFAGATCCTTTAAATT
AAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAATATATAGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT
GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCACTCAATAGTTGCCCTGACTCCCGTCTGTAGATAACTACGA
TACGGGAGGGCTTACCATCTGGGCCAGTGGCTGCAATGATACCGGAGACCCACGCTCACCAGGCTCCAGATTTAT
AGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCCGAGAGTGGTCTTGCACCTTATTCGCCCTCCATCCAGTCTAT
TAATTGTTCCGGGAAAGCTAGAGTAAGTAAAGTATTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGG
CATCGTGGTGTACGCTGCTGCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGGCAGTTACATGGA
TCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCTGTGTCAGAAAGTAAGTTGGCCGAGTGT
TATCACATGTTGTTATGGCAGCAGTGTATAATCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGG
TGAGTACTCAACCAAGTCTATCTGAGAAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCTCAATACGGGA
TAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATTTGGAAAACGTTCTTCCGGGGCAAAAACCTCAAG
GATCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAAUCACACTGTCACCCAACTGATCTCAGCATCTTTTACTTTCA
CCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAAATAGGGGCGACACGGAAAT
GTTGAATACATCACTCTTCCCTTTTCAATATTGAAAGCATTTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACAT
ATTTGAATGJATTTAGAAAATAAACAATAAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTA

AGAAACCTTATATCATGACATTAACCTATAAAAAIAGGCTGATCACGAGGCCCTTTCGTCCTGGGCTTTCCG
TGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCTGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGTGGATGCTGGGA
GCAGACAAGCCCTGACGGGCGGCTACGGGGTGTGGGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGATCAGAG
CAGATTGATCAGAGATGCAACATATGGATCTGAGCGGCCGCAATAAAATATCTTATTTTCAATACATCTGTG
TGTTGGTTTTTGTGTAATCTGTAACATAACCTCTCTCCATCAAAAACAAAACGAAACAAAACAACTAGCAA
AATAGGCTGTCCCAAGTGCAAGTGCAGGTTCCAGAACAATTTCTCATCGAA

5

SEQ ID NO: 5

Secuencia de pORF-mIL-12 (p35p40) (4846 pb)

10

Marco de lectura abierto de mIL-12 en negrita

La secuencia conectora de elastina está subrayada

GGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCTCAGTGGGCAAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTGGGGHGA
GGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCATAGAGAAAGGTGGCGGGGTAAACTGGGAAAAGTATGATGCTGFIACCTGGG'
TCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACG
GGTTTGGCCACAGAACAGCTGAAGCTTCGAG

gtaagtgatataclactagattatcaaaaagagtggtgactgtgngcctcaaatgatactagatcagngagggncacgtcgactactaa
cccttctcttctccacagCTGAGATACCCGGCCGAAGAGGGCCACCAITGGGTCAATCACGCACCTCTCTCTTTTGGCCCA
CCCTTGGCCCTCCTAAACCACTCAAGTTTGGCCAGGGTCAITCCAGTCTCTGGACTCGCCAGGTGTCCTTAGCC
AGTCCCGAAACCTGCTGAAGACCACAGATGACATGGTGAAGACGGCCAGAGAAAAGCTGAAACAATATTTCC
TGCACCTGCTGAAGACATGATCATGAAGACATCACACGGGACCAAAACCAGCACATTGAAGACCTGTTTACC
ACTGGAACTACACAAGAACCAGAGTTGGCTGGCTACTAGAGAGACTTCTTCCACAAACAAGGGGAGCTGCC
TGCCTCCACAGAAGACGCTCTTTGATGATGACCCCTGTGCCCTGGTAGCACTATGAGGACTTGAAGATGTACC
AGACAGAGTTCAGGCCATCAACGCAGCATTFCAGAAATCACAAACATCAGCAGATCATTCTAGACAAGGGC
ATGCTGGTGGCCATCGATGAGCTGATGCCAGTCTCTGAATCATAATGGCGAGACTCTGCCCCAGAAAACCTCTCT
GTGGGAGAAGCAGACCCCTTACAGAGTGAAAATGAAGCTCTGCATCCTGCTTACCGCTTCAGCACCCCGCTG
CGTGACCATCAAACAGGGTGTATGGGCTATCTGAGCTCCGCCCTTCTCTGGAGTAGGGGTACCTGGAGTGGGGC
GATCTATGTGGGAGCTGGAGAAAAGACGTTTATGTGTGAGAGGTGGACTGGACTCCCGATGCCCTGGAGAAA
CAGTGAACTTCACTGTGACACGCCCTGAAGAAGATGACATCACTGACCTCAGACCCAGAGACATGGAGTC
ATAGGCTCTGGAAAAGACCCCTGACCCATCACTGTCAAAGAGTTCCTAGATGCTGGCCAGTACACCTGCCACAA
AGGAGCCGAGACTCTGAGCCACTCACATCTGCTGCTCCACAAAGAAGGAAAATGGAAITTTGGTCCACTGAAA
TTTTAAAATAATTCAAAACAAAGACTTTCTTGAAGTGTGAAGTCAACAAATTAATCTCCGGACGGTTCACCTGCT
CATGGCTGGTCAAAGAAACATGGACTTGAAGTTCACATCAAGAGCAGTAGCAGTCCCCCGACTCTCGG
GCAGTGACATGTGGAAATGGCGTCTCTGCTGACAGAGAAGGTTCACACTGGACCAAAGGGACTATGAGAGTA
TTCAGTGTCTCTGCTCAGGAGGATGTCACTGCCAACCTGCUAGGGAGACCTGCCCATTTGAATGGCGTGTGG
AAGCAAGGCAGCAGATAAATATGAGAACTACAGCACAGCTTCTTATCAGGGACATCATCAAAACAGAC
CCGCCCAAAGAACTTGCAGATGAAAGCTTTTGAAGAACTTCAAGGTGGAGGTACAGCTGGGAGTACTCTGACT
CTGGAGCACCTCCCATCTCTACTCTCCCTCAAGTTCCTTTGTTGCAATCCAGCGAAAGAAAAGAAAGATGAA
GGAGACAGAGAGGGGTGTAAACAGAAAAGGTGGCTTCTCGTAGAGAAGACATCTACCGAAGTCCAATGCA
AAGCGGGAAATGTCTGGCTCAAGCTCAGGATCGCTATTACAATTCCTCATGCAGCAAGTGGGCATGTGTTC
CCTGCAGGGTCCGATCTTAGGATGCAACGGATG

AAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCGC
GTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGAGCTCAAGTCAAGAGGTTGGGAAACCTGAC
AGGACTATAAAGATACACAGGCGTTTCCCTCTGGAAGTCTCTGTTGGCTCTCTCTTCTCGGACTTGGCGTFAACG
GATACCTGTCGCTTTTCTCTCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAAGCGTAGGTAATCAAGTGGTGG
TAGGTGTTGCTTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCTCGTTCAGCCGACTGCTGGCTTATCTGGTAAAT
ATCGTCTTGAATCAACCCGGTAAGACACGATTAATCGCCACTGTCAGCAGTCTACTGTTAAGAGATTAACAGAG
CGAGCTATGTAGGGGTGGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCFAACTACGGCTACACTAGAGAAACAGTATTT
GGTATCTGGCTCTGCTGAAGCCAGTTACTTTGGGAAAAGAGTGGTAGCTTTGATCTGGCAAAACAACCTAC
GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACCGCCAGAAAAGAGGATCTCAAGAAGATCTT
GATCTTCTACCGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACACAGCTTAAAGGGATTTGGTCTAGAGATTAACAAA
AAGGATCTCAGCTAGATCTTTTAAATFAAAAATGAAAGTTTAAATCAATCAAAAGTATATATGAGTAAACCTG
GTCGACAGTFAACCAATGCTTAATCAGTGAAGCCACTATCTCAGCGATCTGTCTAATTCGTTCTATCTAAGTGGC
TGACTCCCGTCTGTFAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCACTGGCCCGCAGTGGCTGCAATGATACGGCA
GACCCACGCTCACCGCTCCAGATTTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCT
GCAACTTTATCCGCTCCATCTCAGTCTATTAAATGTTGGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCCGAGTAAATAGTT
TGCCAAACGTTGTGGCAATGCTACAGGCATCGTGGTGTCAAGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCTATTAGCTCCGG
TCTCCAACGATCAAGCGGAGTACATGATCTCTCAATGTTGCAAAAAGCGGTTTAGCTCTTCCGATC
GTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCTCATGGTTATGGCAGCACTGCAATAATCTCTTACTGCTATGG
CATCCGTAAGATGCTTTCTGCTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCAATCTGAGAAATAGTGTATGCGGAGACCGA
GTTGCTCTTGGCTGGCTCAAAACGGGATTAATACTGCGCCTACATAGCAGAACTTAAAAGTGTCTATCATTTGAAA
AACGTTCTTGGGGGCAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCTCAGTTCGATGTAACCTCTCTGCTG
CAACTGATCTCAGCCTCTTTACTTTAC CAGCGTCTTGGTGGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAAGCGGAAA
AAAAGGAAAATAAGGGGACACGGAAAATGTTGAAATCTCACTCTTCCCTTTTCAATAATATGAAAGCATTTATCA
GGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATAATTTGAAATGATTTAGAAAATAAACAAATAGGGGTTTCTGCTACAT
TTCCTCGAAAAGTGGCACCTTACAGCTTAAAGAAACATTATTTATGACATTAACCTATAAAATAAGGCTGATCA
CGAGGCTCTTGTCTCCGGCTTTCTGGTGTATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCA
CAGCTTTGCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAAGGGCGCTCAGCGGTTTGGCGGGTGTGG
GGCTGGCTTAACTATGCGGCAATCAAGGAGATTTGTTACTGAGAGTGGACCAATATGGATCTCGAGCGGCCGCAATA
AAAATACCTTATTTTACTTACTTACTTGGTGGTTTTTGTGTAATCGTAACATAACCTCCTCCATCAAAA
CAAAACGAAAACAAAACAAATAGCAAAATAGGCTGTCCAGTGCAGGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTATC
GAA

secuencias de tmpk

5

SEQ ID NO: 2

<211> 639

<212> ADN

10

<213> Homo sapiens

ES 2 654 303 T3

atggcggccc ggcgcggggc tctcatagtg ctggagggcg tggaccgcgc cgggaagagc
60
acgcagagcc gcaagctggt ggaagcgctg tgcgccgcgg gccaccgcgc cgaactgctc
120
cggttcccgg aaagatcaac tgaaatcggc aaacttctga gttcctactt gcaaaagaaa
180
agtgacgtgg aggatcactc ggtgcacctg cttttttctg caaatcgctg ggaacaagtg
240
ccgtaatta aggaaaagtt gagccagggc gtgacctcg tcgtggacag atacgcattt
300
tctggtgtgg ccttcaccgg tgccaaggag aatttttccc tagattggtg taaacagcca
360
gacgtggggc ttcccaaacc cgacctggtc ctgttctctc agttacagct ggcggtgct
420
gccaaagcggg gagcgtttgg ccatgagcgc tatgagaacg gggctttcca ggagcggggc
480
ctccggtggt tccaccagct catgaaagac acgactttga actggaagat ggtggatgct
540
tccaaaagca tcgaagctgt ccatgaggac atccgcgtgc tctctgagga cgccatccgc
600
actgccacag agaagccgct gggggagcta tggaagtga
639

SEQ ID NO: 7

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens
Met Ala Ala Arg Arg Gly Ala Leu Ile Val Leu Glu Gly Val Asp Arg
1 5 10 15

Ala Gly Lys Ser Thr Gln Ser Arg Lys Leu Val Glu Ala Leu Cys Ala
20 25 30

Ala Gly His Arg Ala Glu Leu Leu Arg Phe Pro Glu Arg Ser Thr Glu
35 40 45

Ile Gly Lys Leu Leu Ser Ser Tyr Leu Gln Lys Lys Ser Asp Val Glu
50 55 60

ES 2 654 303 T3

Asp His Ser Val His Leu Leu Phe Ser Ala Asn Arg Trp Glu Gln Val
65 70 75 80

Pro Leu Ile Lys Glu Lys Leu Ser Gln Gly Val Thr Leu Val Val Asp
85 90 95

Arg Tyr Ala Phe Ser Gly Val Ala Phe Thr Gly Ala Lys Glu Asn Phe
100 105 110

Ser Leu Asp Trp Cys Lys Gln Pro Asp Val Gly Leu Pro Lys Pro Asp
115 120 125

Leu Val Leu Phe Leu Gln Leu Gln Leu Ala Asp Ala Ala Lys Arg Gly
130 135 140

Ala Phe Gly His Glu Arg Tyr Glu Asn Gly Ala Phe Gln Glu Arg Ala
145 150 155 160

Leu Arg Cys Phe His Gln Leu Met Lys Asp Thr Thr Leu Asn Trp Lys
165 170 175

Met Val Asp Ala Ser Lys Ser Ile Glu Ala Val His Glu Asp Ile Arg
180 185 190

Val Leu Ser Glu Asp Ala Ile Arg Thr Ala Thr Glu Lys Pro Leu Gly
195 200 205

Glu Leu Trp Lys
210

SEQ ID NO: 8

5 <211> 639
<212> ADN
<213> Homo sapiens
atggcggccc gccgcggggc tctcatagtg ctggagggcg tggaccgcgc cgggaagagc
60
acgcagagcc gcaagctggt ggaagcgctg tgcgcccgcg gccaccgcgc cgaactgctc
120
cggttcccgg aaagatcaac tgaaatcggc aaacttctga gttcctactt gcaaaagaaa
180
agtgacgtgg aggatcactc ggtgcacctg ctttttctg caaatcgctg ggaacaagtg
240
ccgtaatta aggaaaagtt gagccagggc gtgaccctcg tcgtggacag atacgcattt
300

ES 2 654 303 T3

tctggtgtgg ccttcaccgg tgccaaggag aatttttccc tagattggtg taaacagcca
360
gacgtggggc ttcccaaacc cgacctggtc ctgttcctcc agttacagct ggcgatgct
420
gccaagcggg gagcgtttgg ccatgagcgc tatgagaacg gggctttcca ggagcgggcg
480
ctccggtgtt tccaccagct catgaaagac acgactttga actggaagat ggtggatgct
540
tccaaaagca tcgaagctgt ccatgaggac atccgcgtgc tctctgagga cgccatccgc
600
actgccacag agaagccgct gggggagcta tggaagtga
639

SEQ ID NO: 9

5 <211> 212
<212> PRT
<213> Homo sapiens
Met Ala Ala Arg Arg Gly Ala Leu Ile Val Leu Glu Gly Val Asp Arg
1 5 10 15

Ala Gly Lys Ser Thr Gln Ser Arg Lys Leu Val Glu Ala Leu Cys Ala
 20 25 30

Ala Gly His Arg Ala Glu Leu Leu Arg Phe Pro Glu Arg Ser Thr Glu
 35 40 45

Ile Gly Lys Leu Leu Ser Ser Tyr Leu Gln Lys Lys Ser Asp Val Glu
 50 55 60

Asp His Ser Val His Leu Leu Phe Ser Ala Asn Arg Trp Glu Gln Val
65 70 75 80

Pro Leu Ile Lys Glu Lys Leu Ser Gln Gly Val Thr Leu Val Val Asp
 85 90 95

Arg Tyr Ala Phe Ser Gly Val Ala Phe Thr Gly Ala Lys Glu Asn Phe
 100 105 110

Ser Leu Asp Trp Cys Lys Gln Pro Asp Val Gly Leu Pro Lys Pro Asp
 115 120 125

Leu Val Leu Phe Leu Gln Leu Gln Leu Ala Asp Ala Ala Lys Arg Gly
 130 135 140

ES 2 654 303 T3

Ala Phe Gly His Glu Arg Tyr Glu Asn Gly Ala Phe Gln Glu Arg Ala
145 150 155 160

Leu Arg Cys Phe His Gln Leu Met Lys Asp Thr Thr Leu Asn Trp Lys
165 170 175

Met Val Asp Ala Ser Lys Ser Ile Glu Ala Val His Glu Asp Ile Arg
180 185 190

Val Leu Ser Glu Asp Ala Ile Arg Thr Ala Thr Glu Lys Pro Leu Gly
195 200 205

Glu Leu Trp Lys
210

SEQ ID NO: 10

5 <211> 636
<212> ADN
<213> Homo sapiens
atggcggccc ggcgcggggc tctcatagtg ctggagggcg tggaccgcgc cgggaagagc
60
acgcagagcc gcaagctggt ggaagcgctg tcgcgcgggc caccgccca actgctccgg
120
ttcccggaaa gatcaactga aatcggcaaa cttctgagtt cctacttgca aaagaaaagt
180
gacgtggagg atcactcggg gcacctgctt tttctgcaa atcgtggga acaagtgccg
240
ttaattaagg aaaagttgag ccaggcgtg accctogtcg tggacagata cgcattttct
300
ggtgtggcct tcaccggtgc caaggagaat tttccctag actggtgtaa acagccagac
360
gtgggccttc ccaaaccoga cctggtcctg ttcctccagt tacagctggc ggatgctgcc
420
aagcggggag cgtttggcca tgagcgctat gagaacgggg ctttccagga gcgggcgctc
480
cgggtgtttcc accagctcat gaaagacacg actttgaact ggaagatggt ggatgcttcc
540
aaaagactcg aagctgtcca tgaggaactc cgcgtgctct ctgaggacgc catccgcact
600
gccacagaga agccgctggg ggagctatgg aagtga
636

10 SEQ ID NO: 11

<211> 211
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 654 303 T3

Met Ala Ala Arg Arg Gly Ala Leu Ile Val Leu Glu Gly Val Asp Arg
 1 5 10 15

Ala Gly Lys Ser Thr Gln Ser Arg Lys Leu Val Glu Ala Leu Ser Arg
 20 25 30

Gly Pro Pro Pro Glu Leu Leu Arg Phe Pro Glu Arg Ser Thr Glu Ile
 35 40 45

Gly Lys Leu Leu Ser Ser Tyr Leu Gln Lys Lys Ser Asp Val Glu Asp
 50 55 60

His Ser Val His Leu Leu Phe Ser Ala Asn Arg Trp Glu Gln Val Pro
 65 70 75 80

Leu Ile Lys Glu Lys Leu Ser Gln Gly Val Thr Leu Val Val Asp Arg
 85 90 95

Tyr Ala Phe Ser Gly Val Ala Phe Thr Gly Ala Lys Glu Asn Phe Ser
 100 105 110

Leu Asp Trp Cys Lys Gln Pro Asp Val Gly Leu Pro Lys Pro Asp Leu
 115 120 125

Val Leu Phe Leu Gln Leu Gln Leu Ala Asp Ala Ala Lys Arg Gly Ala
 130 135 140

Phe Gly His Glu Arg Tyr Glu Asn Gly Ala Phe Gln Glu Arg Ala Leu
 145 150 155 160

Arg Cys Phe His Gln Leu Met Lys Asp Thr Thr Leu Asn Trp Lys Met
 165 170 175

Val Asp Ala Ser Lys Arg Leu Glu Ala Val His Glu Glu Leu Arg Val
 180 185 190

Leu Ser Glu Asp Ala Ile Arg Thr Ala Thr Glu Lys Pro Leu Gly Glu
 195 200 205

Leu Trp Lys
 210

SEQ ID NO: 12

- 5 <211> 639
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

ES 2 654 303 T3

atggcggccc ggcgcggggc tctcatagtg ctggagggcg tggaccgcgc cgggaagagc
60
acgcagagcc gcaagctggg ggaagcgctg tgcgcgcggg gccaccgcgc cgaactgctc
120
cggttcccgg aaagatcaac tgaaatcggc aaacttctga gttcctactt gcaaaagaaa
180
agtgacgtgg aggatcactc ggtgcacctg ctttttctg caaatcgctg ggaacaagtg
240
ccgtaatta aggaaaagtt gagccagggc gtgaccctcg tcgtggacag atacgcattt
300
tctggtgtgg ccttcaccgg tgccaaggag aatttttccc tagattggtg taaacagcca
360
gacgtggggc ttcccaaacc cgacctggtc ctgttctctc agttacagct ggcggatgct
420
gccaagcggg gagcgtttgg ccatgagcgc tatgagaacg gggctttcca ggagcgggcg
480
ctccggtggt tccaccagct catgaaagac acgactttga actggaagat ggtggatgct
540
tccaaaagca tcgaagctgt ccatgaggac atccgcgtgc tctctgagga cgccatccgc
600
actgccacag agaagccgct gggggagcta tggaaggac
639

SEQ ID NO: 13

5 <211> 213
<212> PRT
<213> Homo sapiens
Met Ala Ala Arg Arg Gly Ala Leu Ile Val Leu Glu Gly Val Asp Arg
1 5 10 15

Ala Gly Lys Ser Thr Gln Ser Arg Lys Leu Val Glu Ala Leu Cys Ala
20 25 30

Ala Gly His Arg Ala Glu Leu Leu Arg Phe Pro Glu Arg Ser Thr Glu
35 40 45

Ile Gly Lys Leu Leu Ser Ser Tyr Leu Gln Lys Lys Ser Asp Val Glu
50 55 60

Asp His Ser Val His Leu Leu Phe Ser Ala Asn Arg Trp Glu Gln Val

ES 2 654 303 T3

| | | | |
|---|---|-----|-----|
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Pro Leu Ile Lys | Glu Lys Leu Ser Gln Gly Val Thr Leu Val Val Asp | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Arg Tyr Ala Phe Ser Gly Val Ala Phe Thr Gly Ala Lys Glu Asn Phe | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Ser Leu Asp Trp Cys Lys Gln Pro Asp Val Gly Leu Pro Lys Pro Asp | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| Leu Val Leu Phe Leu Gln Leu Gln Leu Ala Asp Ala Ala Lys Arg Gly | | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| Ala Phe Gly His Glu Arg Tyr Glu Asn Gly Ala Phe Gln Glu Arg Ala | | | |
| | 145 | 150 | 155 |
| Leu Arg Cys Phe His Gln Leu Met Lys Asp Thr Thr Leu Asn Trp Lys | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Met Val Asp Ala Ser Lys Ser Ile Glu Ala Val His Glu Asp Ile Arg | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Val Leu Ser Glu Asp Ala Ile Arg Thr Ala Thr Glu Lys Pro Leu Gly | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| Glu Leu Trp Lys Asp | | | |
| | 210 | | |

SEQ ID NO: 14

5 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

| | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| atggcgctcgc | gtcgggggagc | gctcatcgtg | ctggagggtg | tggaccgtgc | tggcaagacc |
| 60 | | | | | |
| acgcagggcc | tcaagctggt | gaccgcgctg | tgcgcctcgg | gccacagagc | ggagctgctg |
| 120 | | | | | |
| cgtttccccg | aaagatcaac | ggaaatcggc | aagcttctga | attcctactt | ggaaaagaaa |
| 180 | | | | | |
| acggaactag | aggatcactc | cgtgcacctg | ctcttctctg | caaaccgctg | ggaacaagta |
| 240 | | | | | |
| ccattaatta | aggcgaagtt | gaaccagggg | gtgacccttg | ttttggacag | atacgctttt |
| 300 | | | | | |
| tctgggggtg | ccttcaactg | tgccaaagag | aatttttccc | tggattggtg | taaacaaccg |
| 360 | | | | | |

ES 2 654 303 T3

gacgtgggcc ttcccaaacc tgacctgac ctgttccttc agttacaatt gctggacgct
420
gctgcacggg gagagtttgg ccttgagcga tatgagaccg ggactttcca aaagcaggtt
480
ctgttgtggt tccagcagct catggaagag aaaaacctca actggaaggt ggttgatgct
540
tccaaaagca ttgaggaagt ccataaagaa atccgtgcac actotgagga cgccatocga
600
aacgctgcac agaggccact gggggagcta tggaataa
639

SEQ ID NO: 15

5 <211> 212
<212> PRT
<213> Mus musculus
Met Ala Ser Arg Arg Gly Ala Leu Ile Val Leu Glu Gly Val Asp Arg
1 5 10 15
Ala Gly Lys Thr Thr Gln Gly Leu Lys Leu Val Thr Ala Leu Cys Ala
20 25 30
Ser Gly His Arg Ala Glu Leu Leu Arg Phe Pro Glu Arg Ser Thr Glu
35 40 45
Ile Gly Lys Leu Leu Asn Ser Tyr Leu Glu Lys Lys Thr Glu Leu Glu
50 55 60
Asp His Ser Val His Leu Leu Phe Ser Ala Asn Arg Trp Glu Gln Val
65 70 75 80
Pro Leu Ile Lys Ala Lys Leu Asn Gln Gly Val Thr Leu Val Leu Asp
85 90 95
Arg Tyr Ala Phe Ser Gly Val Ala Phe Thr Gly Ala Lys Glu Asn Phe
100 105 110
Ser Leu Asp Trp Cys Lys Gln Pro Asp Val Gly Leu Pro Lys Pro Asp
115 120 125
Leu Ile Leu Phe Leu Gln Leu Gln Leu Leu Asp Ala Ala Ala Arg Gly
130 135 140
Glu Phe Gly Leu Glu Arg Tyr Glu Thr Gly Thr Phe Gln Lys Gln Val
145 150 155 160

ES 2 654 303 T3

Leu Leu Cys Phe Gln Gln Leu Met Glu Glu Lys Asn Leu Asn Trp Lys
 165 170 175

Val Val Asp Ala Ser Lys Ser Ile Glu Glu Val His Lys Glu Ile Arg
 180 185 190

Ala His Ser Glu Asp Ala Ile Arg Asn Ala Ala Gln Arg Pro Leu Gly
 195 200 205

Glu Leu Trp Lys
 210

SEQ ID NO: 16

5

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

Met Ala Ala Arg Arg Gly Ala Leu Ile Val Leu Glu Gly Val Asp Arg
 1 5 10 15

Ala Gly Lys Ser Thr Gln Ser Arg Lys Leu Val Glu Ala Leu Cys Ala
 20 25 30

Ala Gly His Arg Ala Glu Leu Leu Arg Phe Pro Glu Arg Ser Thr Glu
 35 40 45

Ile Gly Lys Leu Leu Ser Ser Tyr Leu Gln Lys Lys Ser Asp Val Glu
 50 55 60

Asp His Ser Val His Leu Leu Phe Ser Ala Asn Arg Trp Glu Gln Val
 65 70 75 80

Pro Leu Ile Lys Glu Lys Leu Ser Gln Gly Val Thr Leu Val Val Asp
 85 90 95

Arg Tyr Ala Phe Ser Gly Val Ala Tyr Thr Gly Ala Lys Glu Asn Phe
 100 105 110

Ser Leu Asp Trp Cys Lys Gln Pro Asp Val Gly Leu Pro Lys Pro Asp
 115 120 125

Leu Val Leu Phe Leu Gln Leu Gln Leu Ala Asp Ala Ala Lys Arg Gly
 130 135 140

Ala Phe Gly His Glu Arg Tyr Glu Asn Gly Ala Phe Gln Glu Arg Ala

ES 2 654 303 T3

Arg Ala Arg Gly Gln Leu Asp Arg Tyr Glu Asn Gly Ala Phe Gln Glu
145 150 155 160

Arg Ala Leu Arg Cys Phe His Gln Leu Met Lys Asp Thr Thr Leu Asn
165 170 175

Trp Lys Met Val Asp Ala Ser Lys Ser Ile Glu Ala Val His Glu Asp
180 185 190

Ile Arg Val Leu Ser Glu Asp Ala Ile Ala Thr Ala Thr Glu Lys Pro
195 200 205

Leu Gly Glu Leu Trp Lys
210

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de vector o virus aislado que comprende:
 un vector lentiviral; y
 un casete de expresión de IL-12, que comprende un polinucleótido, que codifica un polipéptido p35 y un polipéptido p40; o un polipéptido de fusión de IL-12 que activa el receptor de IL-12;
 para su uso en el tratamiento de un sujeto humano con cáncer o con un mayor riesgo de cáncer en donde el uso comprende la transfección o la transducción de una célula cancerosa con el fin de suministrar IL-12 al sujeto, en donde la célula de cáncer transfectada o transducida secreta IL-12 por encima de un nivel umbral de al menos 1.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas.
2. La construcción de vector o virus aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el casete de expresión de IL-12 comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión de IL-12, en donde el polinucleótido tiene al menos 70% de identidad de secuencia con la porción de IL-12 de los SEQ ID NO: 4 o 5 y el polipéptido codificado se une a un receptor de IL-12.
3. La construcción de vector o virus aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el vector lentiviral comprende uno o más de una cadena principal de pHR', un elemento delta-GAG, un Elemento de Respuesta a Rev (RRE) y un elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE) y uno o más de: una repetición terminal larga 5' (LTR), una secuencia señal de VIH, un sitio de empalme 5' de la señal Psi del VIH (SD), un sitio de empalme 3' (SA), un promotor del factor de Elongación alfa-1 (EF) y una LTR de auto-inactivación 3' (SIN-LTR), un tramo central de polipurina que tiene opcionalmente una secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 2 o una secuencia de nucleótidos con al menos 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 2; opcionalmente en donde el elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE) tiene una secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 3 o una secuencia de nucleótidos con al menos 70% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 3, preferiblemente en donde la construcción de vector o virus aislado comprenden un elemento delta-GAG, RRE, WPRE, LTR, secuencia de señal de VIH, SD, SA y SIN-LTR.
4. La construcción de vector o virus aislado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente un polinucleótido que codifica un polipéptido activador que convierte un profármaco en un fármaco.
5. La construcción de vector o virus aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el polinucleótido activador es un polinucleótido tmpk modificado, y preferiblemente en donde el polinucleótido activador comprende un polinucleótido tmpk modificado con al menos 80% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 8, y/o el SEQ ID NO: 10, y/o el SEQ ID NO: 12, y/o el SEQ ID NO: 14; y preferiblemente, en donde la construcción de vector o virus aislado comprenden adicionalmente un casete de detección y/o un casete inmunomodulador.
6. La construcción de vector o virus aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, que comprenden el casete de detección y/o el casete inmunomodulador, en donde el casete de detección comprende un polinucleótido seleccionado entre CD19, CD19 truncado, CD20, CD24 humano, HSA murino, CD25 humano (huCD25), una forma truncada de baja afinidad del receptor del factor de crecimiento nervioso (LNGFR), CD34 truncado, eGFP, eYFP, y cualquier otra proteína fluorescente o receptor de eritropoyetina (EpoR); o, alternativamente, un polinucleótido con al menos 70% de identidad de secuencia con cualquiera de dichos polinucleótidos; y/o en donde el casete inmunomodulador comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que modula una célula inmunitaria, y preferiblemente en donde la célula inmunitaria es una célula dendrítica o una célula T, cuya célula T es preferiblemente una célula T CD4+, y/o en donde el casete inmunomodulador comprende un polinucleótido que codifica CD40L, IL-7, o IL-15.
7. Una célula aislada y/o transducida que secreta IL-12 a un nivel umbral o por encima del mismo, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano con cáncer o con un mayor riesgo de cáncer, en donde la célula se transduce con la construcción de vector o virus aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición que comprende dicha construcción de vector o virus aislado, y en donde la célula es una célula cancerosa cuya célula cancerosa es de una línea celular establecida, o alternativamente, cuya célula cancerosa es una célula de cáncer primaria, o una célula de cáncer derivada de un sujeto y/o una célula leucémica, en donde la célula leucémica es preferiblemente una célula de LLA o una célula de LLC; y, en donde el que el nivel umbral es de al menos 1.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12, y preferiblemente en donde el nivel umbral es de 1500-2.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 2.500-5.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 5.000-7.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 7.500-10.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 10.000-12.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 12.500-15.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 15.000-17.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 17.500-20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas o al menos 20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12.
8. Una población de células aisladas y/o transducidas que secretan IL-12 que comprende una pluralidad de células

- como se define en la reivindicación 7 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, cuya población comprende al menos de 0,1 a 1% células cancerosas que producen IL-12, y preferiblemente 0,5%, o 1% o 1-5% o 5-10%, o 10-20% o más células cancerosas productoras de IL-12, y en donde la población de células secreta IL-12 por encima de un nivel umbral necesario para inducir o mejorar una respuesta inmunitaria dependiente de células T CD4+, cuyo nivel umbral es de al menos 1.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 1.500-2.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 2.500-5.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 5.000-7.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 7.500-10.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 10.000-12.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 12.500-15.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 15.000-17.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 17.500-20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas o al menos 20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12.
9. Una composición que comprende la construcción de vector, el virus aislado, la célula o la población de células para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un método ex vivo para expresar IL-12 en una célula, cuya célula es una célula cancerosa, que comprende poner en contacto la célula con la construcción de vector o virus aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición que comprende dicha construcción de vector o dicho virus aislado, en condiciones que permiten la transfección o transducción de la célula, en donde el nivel de IL-12 producido es superior a un nivel umbral que mejora la maduración de células dendríticas y/o la presentación de antígenos cuyo nivel umbral es al menos de 1.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 1.500-2.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 2.500-5.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 5.000-7.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 7.500-10.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 10.000-12.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 12.500-15.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 15.000-17.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 17.500-20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas o al menos 20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12, y preferiblemente en donde la IL-12 es secretada, y preferiblemente en donde el método comprende adicionalmente una etapa de aislamiento de la célula transducida o de aislamiento de una población de células que comprende la célula transducida, y/u opcionalmente la detención del crecimiento de la célula transducida.
11. La construcción de vector o virus aislado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, la célula secretora de IL-12, o la población de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 9, y/o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el uso comprende la reducción del número de células tumorales o la carga de cáncer en un sujeto humano que lo necesita, en donde el cáncer es leucemia, y preferiblemente en donde la leucemia es LLA, LMA, LMC, o LLC.
12. La célula secretora de IL-12 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 o la población de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la célula o las células es/son células de la leucemia para su uso en el tratamiento de un sujeto humano con leucemia.
13. Un método de preparación de una composición para el suministro de IL-12 a un sujeto humano, cuyo sujeto tiene cáncer o en mayor riesgo de cáncer, comprendiendo el método:
- la generación de una célula secretora de IL-12 poniendo en contacto una célula cancerosa con una construcción de vector o virus aislado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición que comprende dicha construcción de vector o virus aislado en condiciones que permiten la transfección o transducción de la célula cancerosa, en donde la IL-12 secretada por célula está por encima de un nivel umbral, cuyo nivel umbral es de al menos 1.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 1.500-2.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 2.500-5.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 5.000-7.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 7.500-10.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 10.000-12.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 12.500-15.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 15.000-17.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 17.500-20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas o al menos 20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12; y
 - aislar un número eficaz de las células secretoras de IL-12 generadas para su introducción en el sujeto, en donde el vector lentiviral comprende un CPPT y/o WPRE, y opcionalmente en donde el método comprende adicionalmente la detención del crecimiento de las células secretoras de IL-12, por ejemplo por irradiación.
14. La célula secretora de IL-12 o población de células para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 y 12, en donde la célula cancerosa deriva de un sujeto con cáncer, y preferiblemente en donde el cáncer es una leucemia, y más preferiblemente en donde la leucemia es LLA, LMA, LMC o LLC; y/o en donde la respuesta inmunitaria iniciada está sustancialmente libre de inducir o potenciar una respuesta inmunitaria dependiente de células T CD8⁺, y/o inducir o potenciar citoquinas antagónicas; y en donde la IL-12 secretada por la célula está por encima de un nivel umbral cuyo nivel umbral es de al menos 1.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 1.500-2.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 2.500-5.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 5.000-7.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 7.500-10.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 10.000-12.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 12.500-15.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 15.000-17.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 17.500-20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas o al menos 20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12.
15. La célula secretora de IL-12 o población de células para su uso de acuerdo con una cualquiera de 7, 8, 11, 12 y 14, en donde el nivel de IL-12 producida está por encima de un nivel umbral que mejora la maduración de células dendríticas y/o la presentación de antígenos en donde la IL-12 secretada por la célula está por encima de un nivel

umbral cuyo nivel de umbral es de al menos 1500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 1.500-2.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 2.500-5.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 5.000-7.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 7.500-10.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 10.000-12.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 12.500-15.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 15.000-17.500 pg/ml/10⁶ células/2 horas, o 17.500-20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas o al menos 20.000 pg/ml/10⁶ células/2 horas de IL-12.

5
10 16. La construcción de virus, el virus aislado, la célula secretora de IL-12, la población de células para su uso o el método de cualquier reivindicación precedente, en donde el cáncer se selecciona de un cáncer sólido y una leucemia, preferiblemente una leucemia; y/o la célula cancerosa se selecciona entre una célula de cáncer sólido y una célula de leucemia, preferiblemente una célula de leucemia.

15 17. La célula secretora de IL-12 o la población de células para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7, 8, 12, 14 a 16, o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el uso comprende poner en contacto y/o expandir las células dendríticas y las células T ex vivo con la célula secretora de IL-12, la población de células, o la composición, y administrar al sujeto las células dendríticas y T en contacto y/o expandidas con o sin la célula transducida o la población de células.

20 18. La célula secretora de IL-12 o la población de células para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la célula es, o la población de células comprende, una célula de leucemia y el cáncer es leucemia.

FIGURA 1A

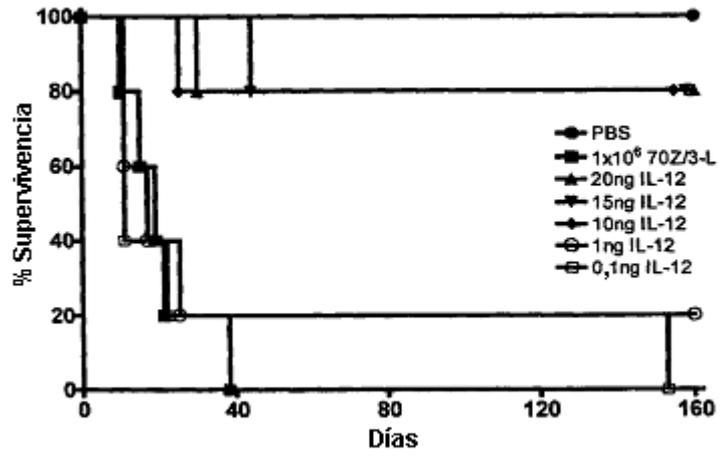


FIGURA 1B

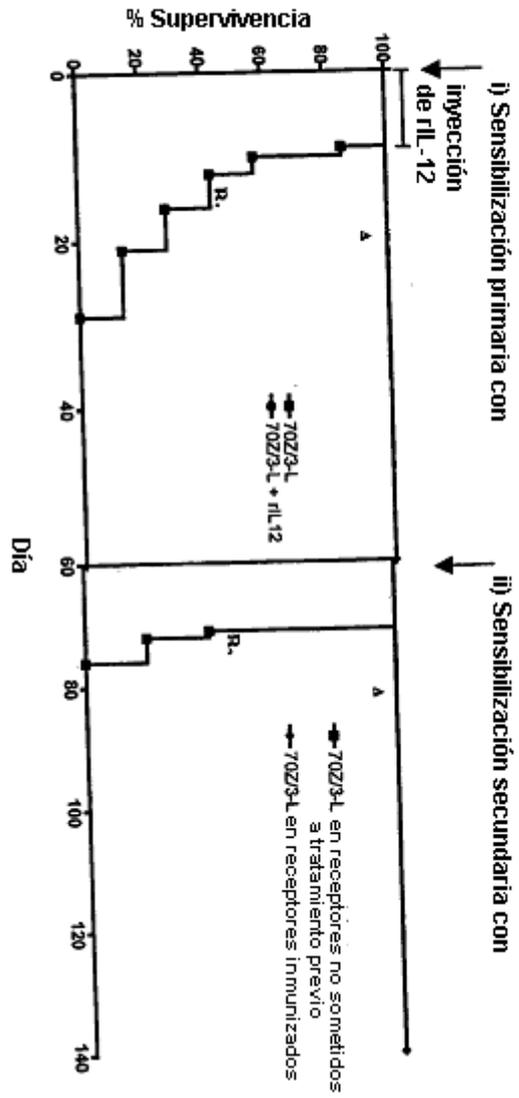


FIGURA 1C

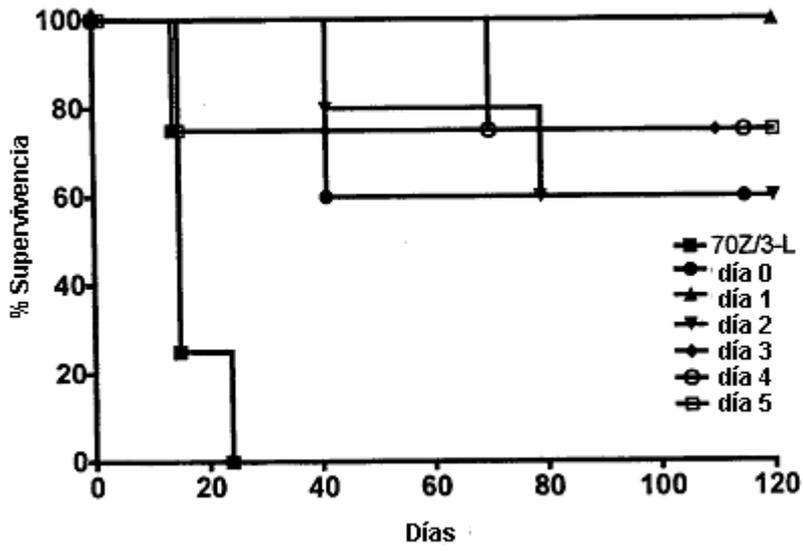


FIGURA 1D

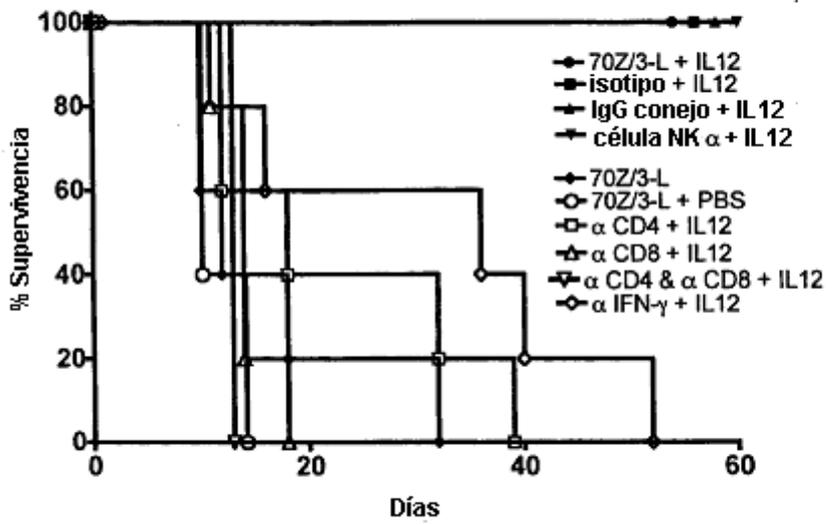


FIGURA 2A

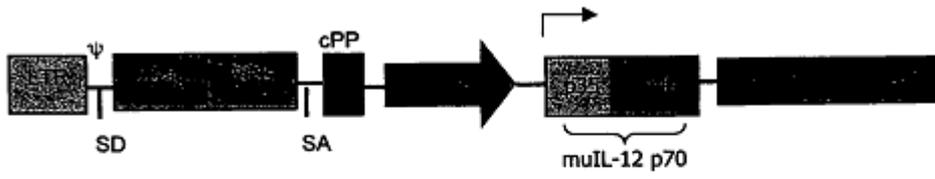


FIGURA 2B

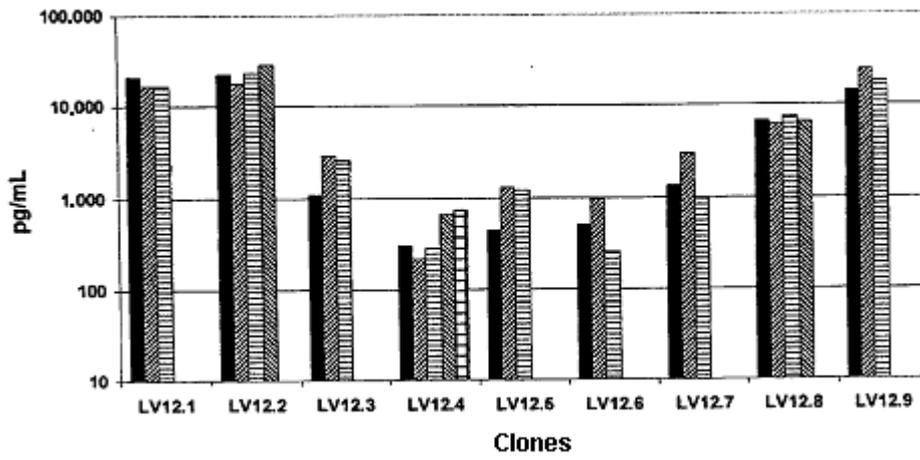


FIGURA 3

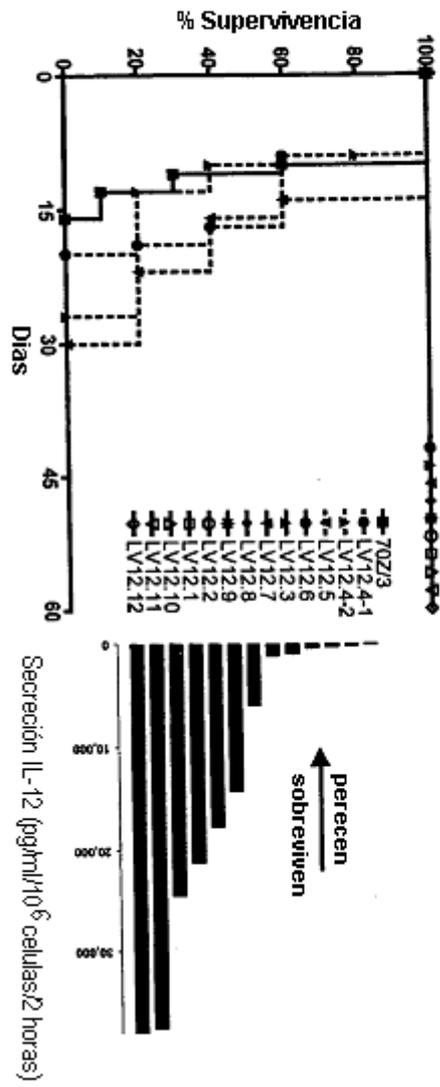
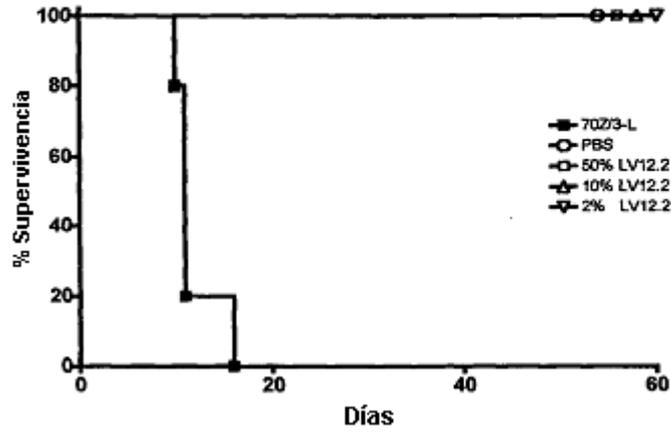


FIGURA 4

a.)



b.)

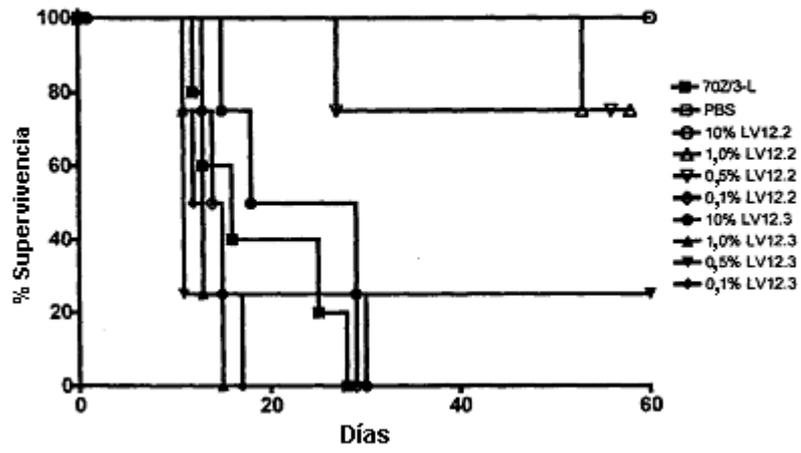


FIGURA 5

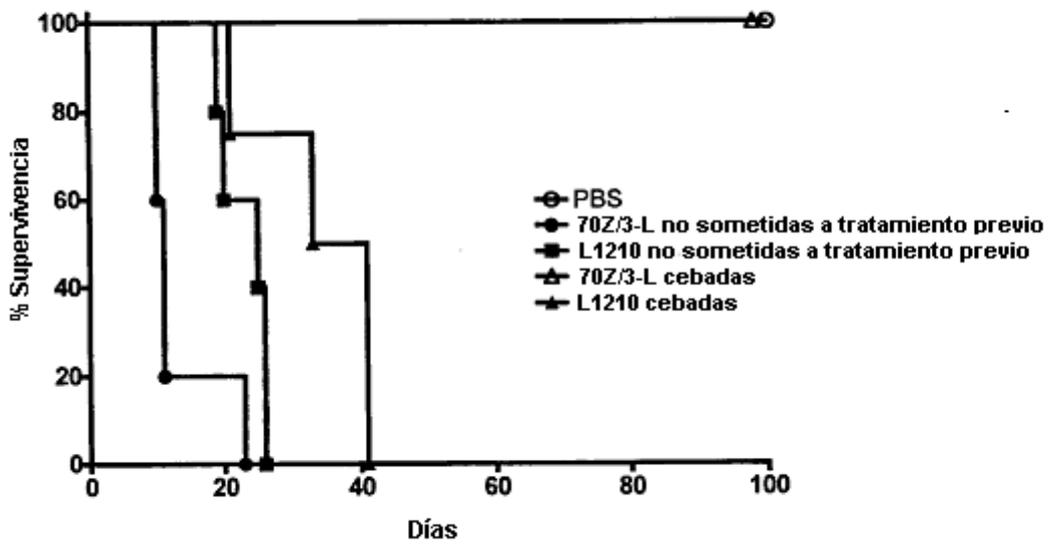


FIGURA 6

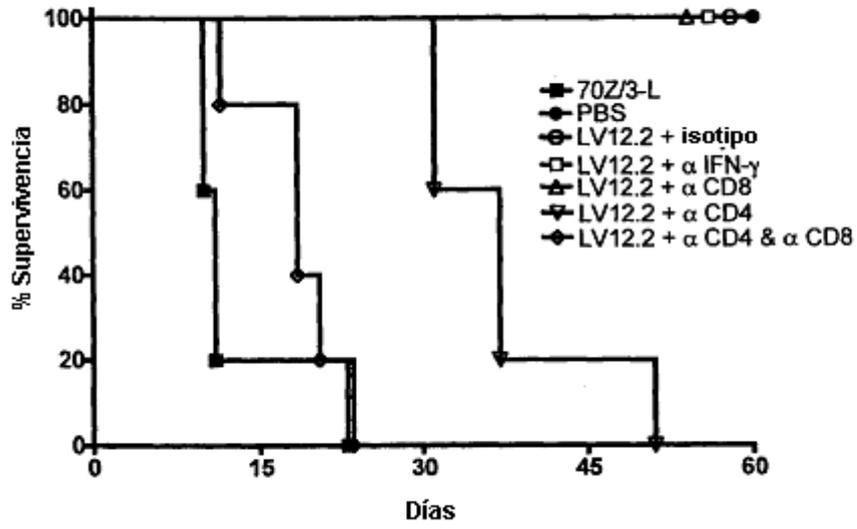


FIGURA 7

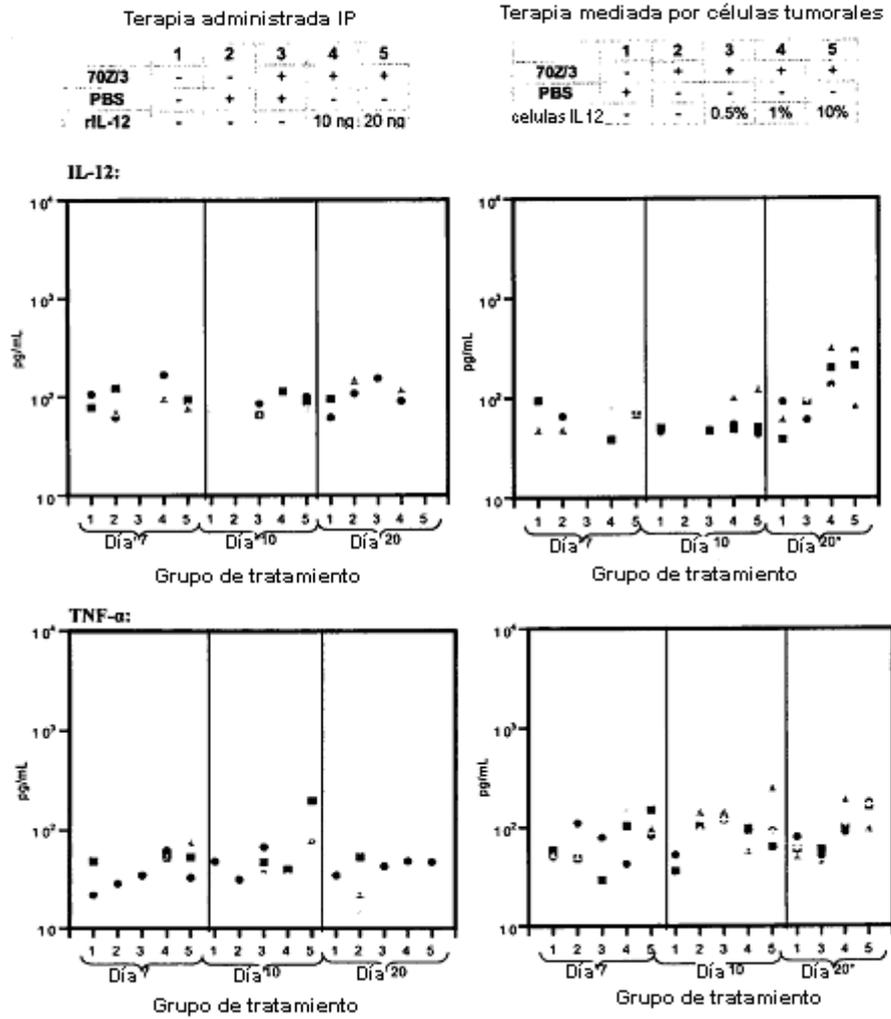


FIGURA 7 (CONTINUACIÓN)

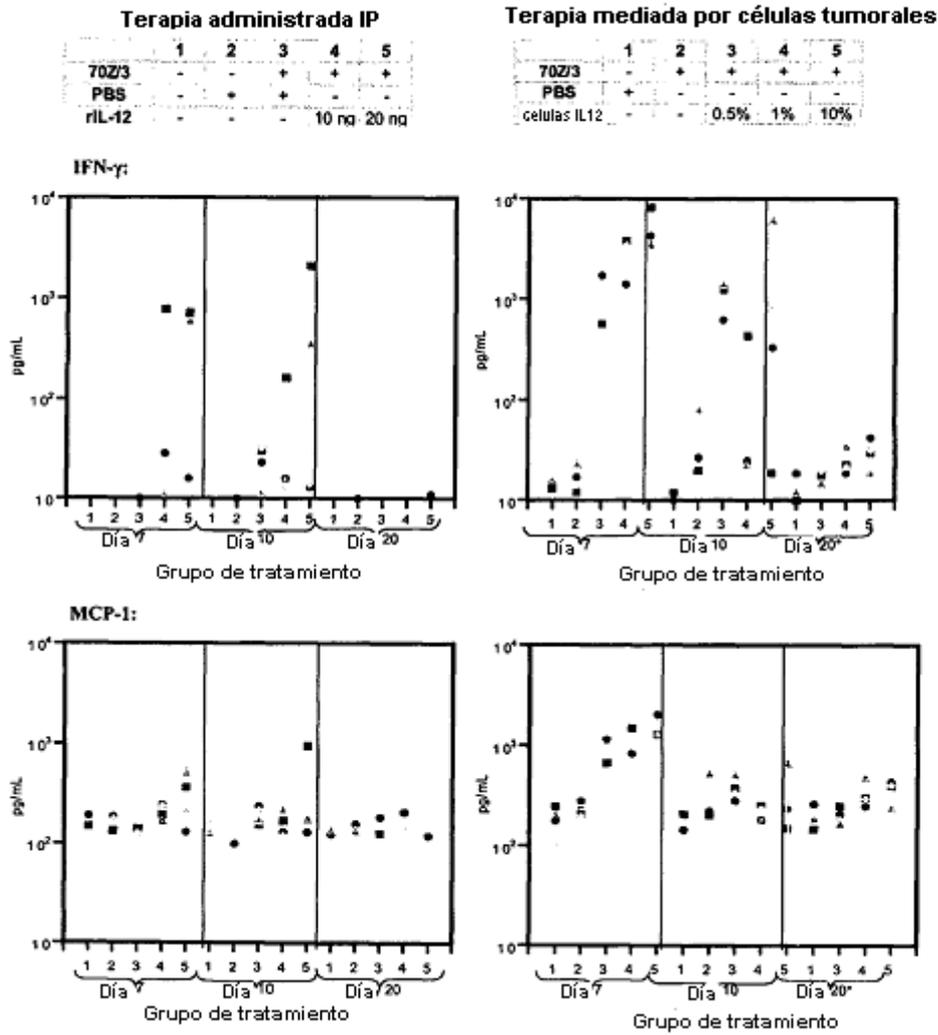


FIGURA 7 (CONTINUACIÓN)

