

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 538**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/83** (2006.01)

**C12N 15/84** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 39/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2005 E 10075517 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2295588**

54 Título: **Células presentadoras de antígeno artificiales novedosas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**27.05.2004 US 575712**

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

**18.05.2018**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF  
PENNSYLVANIA (100.0%)  
Center for Technology Transfer, 3160 Chestnut  
Street, Suite 200  
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**RILEY, JAMES L;  
JUNE, CARL, H.;  
VONDERHEIDE, ROBERT, H;  
AQUI NICOLE y  
SUHOSKI, MEGAN**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 668 538 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

Células presentadoras de antígeno artificiales novedosas y usos de las mismas

**Declaración referente a la investigación o el desarrollo con respaldo federal**

5 Esta investigación estuvo respaldada en parte por fondos estatales de EE.UU. (subvenciones de los Institutos Nacionales de Salud R21 AI060477, R01 CA105216 y R01 AI 057838 y, por tanto, el gobierno de EE.UU. puede tener ciertos derechos en la invención.

**Antecedentes de la invención**

10 La transferencia adoptiva es un término acuñado por Medawar (1954, Proc. Royal Soc. 143:58-80) para estudiar el rechazo de aloinjertos. El término inmunoterapia adoptiva indica la transferencia de células inmunocompetentes para el tratamiento de cáncer o enfermedades infecciosas (June, C.H., ed., 2001, En: Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore; Vonderheide *et al.*, 2003, Immun. Research 27:1-15). La terapia adoptiva puede considerarse una estrategia dirigida a reemplazar, reparar o potenciar la función biológica de un tejido o sistema dañado por medio de células autólogas o alogénicas. La primera infusión satisfactoria de células T CD4 policlonales, infectadas por VIH, expandidas *ex vivo*, que permitió un alto grado de injerto tras la infusión, se realizó usando perlas magnéticas recubiertas con perlas anti-CD3 y anti-CD28 (perlas recubiertas con CD3/28) para expandir *ex vivo* las células T de individuos infectados por VIH. Se les administraron a 15 ocho pacientes 51 infusiones de células CD4 coestimuladas según este protocolo con acontecimientos adversos mínimos (Levine *et al.*, 2002, Nature Med. 8:47-53).

20 La infección por VIH induce una expansión pronunciada de células T CD8 específicas de VIH. Estas células T CD8 liberan factores solubles (Walker *et al.*, 1986, Science 234:1563-1566; Zhang *et al.*, 2002, Science 298:995-1000; Cocchi *et al.*, 1995, Science 270:1811-1815) que limitan la replicación de VIH así como lisan directamente células infectadas por VIH (Walker *et al.*, 1987, Nature 328:345-348; Koup *et al.*, 1994, J. Virol. 68:4650-4655). La reducción de células T CD8 antes de la exposición a VIS conduce a replicación viral descontrolada y una muerte rápida, lo que indica que la actividad de las células T CD8 es necesaria para hacer que el VIH sea una enfermedad crónica (Schmitz *et al.* 1999, Science 283:857-860; Jin *et al.*, 1999, J. Exp. Med. 189:991-998). Sin embargo, las células T CD8 no pueden controlar en última instancia la infección por VIH. Se ha mostrado que las células T específicas de VIH tienen una expresión de perforina altamente reducida (Zhang *et al.*, 2003, Blood 101:226-235; Appay, *et al.*, 2000, J. Exp. Med. 192:63-75), regulación por disminución de dos receptores de señalización clave, CD3 $\zeta$  y CD28 (Trimble *et al.*, 2000, Blood 96:1021-1029), un patrón de maduración sesgado (Appay *et al.*, 2002, Nature Med. 8, 379-385) y una alta sensibilidad a apoptosis inducida por Fas (Mueller *et al.*, 2001, Immunity, 15:871-882). Por tanto, se cree que una activación óptima de células T CD8 específicas de VIH restaurará funciones efectoras.

35 Las perlas recubiertas (CD3/28) anti-CD3 y anti-CD28 fueron la primera generación de APC artificiales (aAPC) que permitieron la expansión de células T CD4 infectadas por VIH (Levine *et al.*, 1996, Science 272:1939-1943). Además de suministrar las señales necesarias para la activación y el crecimiento de células T, la estimulación con perlas con CD3/28 vuelve las células T resistentes a la infección por R5 regulando por disminución CCR5 y regulando por incremento la expresión de sus ligandos, las  $\beta$ -quimiocinas RANTES, proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) y MIP-1 $\beta$  (Riley *et al.*, 1997, J. Immunol. 158:5545-5553 Carroll *et al.*, 1997, Science 276:273-276). Varios ensayos de fase I y II han demostrado que la infusión de células T CD4 autólogas expandidas usando perlas recubiertas con CD3/28 en individuos infectados por R5 es tanto segura como factible (Carroll *et al.*, 1997, Science 276:273-276; Levine *et al.*, 2002, Nature Med. 8:47-53; Walker *et al.*, 2000, Blood 96:467-474; Ranga *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95:1201-1206). De manera más importante, se observaron aumentos sostenidos del recuento de linfocitos total, la razón de células T CD4 con respecto a CD8, la fracción de células T secretoras de citocinas y la capacidad para responder a antígenos de recuerdo, sugiriendo que inmunoterapia adoptiva de células T puede restaurar al menos una función inmunitaria limitada de nuevo en individuos infectados por VIH (Levine *et al.*, 45 2002, Nature Med. 8:47-53). A pesar del éxito de estos ensayos iniciales, se observaron varias limitaciones, incluyendo la dificultad de (1) expandir células T CD8, (2) añadir señales coestimuladoras adicionales que pueden requerirse para expandir determinados subconjuntos de células T, (3) retirar las perlas antes de la infusión y (4) generar células T específicas de antígeno con un alto potencial de injerto.

50 Otros han usado perlas recubiertas con CD3/28 de expansión de células T para introducir células T modificadas génicamente en pacientes infectados por VIH. En estos estudios (Walker *et al.*, 2000, Blood 96:467-474; Mitsuyasu *et al.*, 2000, Blood 96:785-793; Deeks *et al.*, 2002, Mol. Ther. 5:788-797), se introdujo una molécula quimérica que consistía en el dominio extracelular de CD4 y el dominio intracelular de la cadena zeta de CD3 (se introdujo CD4 $\zeta$  en células T CD4 mediante transducción retroviral). Se detectaron las células T modificadas con CD4 $\zeta$  mediante PCR de ADN en la sangre periférica de todos los pacientes tras la infusión, y se mantuvieron niveles medios del 1-3% de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales en todos los puntos de tiempo tras la infusión. En un seguimiento ampliado, se detectó CD4 $\zeta$  en la sangre de 17 de 18 pacientes un año tras la infusión. Estos niveles de injerto sostenido son varios órdenes de magnitud mayores que lo que se observó previamente para infusiones de células T humanas T, quizás porque las técnicas previas de cultivo celular pueden haber inducido susceptibilidad a la apoptosis o senescencia replicativa (Rosenberg *et al.*, 1990, N. Engl. J. Med. 323:570-578; Yee *et al.*, 2002, Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16168-16173; Brodie *et al.*, 1999, Nature Med. 5:34-41; Riddell *et al.*, 1996, Nature Med. 2:216-223; Riddell *et al.*, 2000, Cancer Journal 6:S250-S258). Estos resultados clínicos indican que células T coestimuladas propagadas con aAPC basadas en perlas son seguras y tienen la capacidad para un injerto prolongado. Sin embargo, debido al número limitado de sujetos de estudio y la duración de tiempo requerida para lograr un criterio de valoración clínico en un ensayo terapéutico de VIH, no pudo medirse la significación estadística del beneficio clínico de la transferencia de células T CD4 autólogas a individuos infectados por VIH.

Aunque son potencialmente eficaces para limitar la inmunodeficiencia, es probable que las células T CD4 policlonales sólo tengan un efecto moderado sobre la respuesta específica a VIH. Se ha estudiado la inmunoterapia de infección viral en seres humanos usando transferencia adoptiva de células T CD8 específicas de antígeno en el entorno de infección por CMV, VEB y VIH. Se ha evaluado este enfoque usando clones de células T con especificidad antigénica restringida por HLA para CMV (Riddell *et al.*, 1992, Science 257:238-241; Walter *et al.*, 1995, N. Engl. J. Med. 333:1038-1044). Se expandieron *ex vivo* células T CD8<sup>+</sup> específicas de CMV aisladas de donantes de médula ósea de MHC idéntico y se administraron a 14 receptores de trasplante de médula ósea alogénico. Se observó la recuperación de la actividad CTL específica de CMV en cada caso y CTL sometidos a transferencia adoptiva persistieron *in vivo* durante hasta 12 semanas. En un estudio similar, se administraron células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicas de VEB derivadas de donantes, marcadas genéticamente con el gen de resistencia a neomicina, a 6 receptores de aloinjertos de médula ósea alogénicos con reducción de células T (Rooney *et al.*, 1995, Lancet 345:9-13; Heslop *et al.*, 1996, Nature Med. 2:551-555). Las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> marcadas genéticamente que responden a la exposición *in vivo* o *ex vivo* a VEB persistieron a bajas frecuencias *in vivo* durante hasta 18 meses después de la infusión. La infusión de células T CD8 con una única especificidad para VIH (Nef) (Koenig *et al.*, 1995, Nature Med. 1:330-336) en un paciente demostró selección de CTL de variantes virales lo que indica que la infusión de células T específicas de VIH frente a múltiples dianas puede ser necesaria para controlar la replicación de VIH. En todos estos estudios, la incapacidad de la amplia mayoría de estas células T para injertarse ha limitado el estudio de los efectos a largo plazo de la inmunoterapia de células T CD8 específicas de antígeno. Un reto importante en el campo es expandir células T CD8 que se injertarán y tendrán potentes funciones efectoras a largo plazo para luchar de forma más eficaz contra las infecciones crónicas. Sin embargo, a pesar de la necesidad a largo plazo de números suficientes de células T terapéuticas, no hay métodos disponibles para expandir estas células.

Las células T específicas de VIH pueden contener pero no erradicar el VIH. Algunos estudios que han retirado células T CD8 antes de, o durante, la infección por VIH han demostrado una replicación viral descontrolada y una progresión mucho más rápida a SIDA, lo que indica que las células T CD8 son importantes en el control de VIH (Schmitz *et al.* 1999, Science 283:857-860; Jin *et al.*, 1999, J. Exp. Med. 189:991-998). Sin embargo, las células T específicas de VIH carecen, en general, de expresión de perforina (Gandhi *et al.*, 2002, Annu. Rev. Med. 53:149-172) y otras funciones efectoras requeridas para eliminar el VIH del huésped. Algunos estudios de pacientes sin progresión a largo plazo indicaron que es más probable que proliferen células T específicas de VIH de estos individuos y contengan perforina, demostrando que las células T CD8 con funciones efectoras potenciadas pueden retardar la progresión a SIDA (Migueles *et al.*, 2002, Nature Immunol. 3:1061-1068). Otros investigadores han demostrado que dos receptores de señalización clave, CD3 $\zeta$  y CD28 están regulados por disminución en células T específicas de VIH (Trimble *et al.*, 2000, Blood 96:1021-1029; Trimble *et al.*, 1998, Blood 91:585-594; Trimble *et al.*, 2000, J. Virol. 74:7320-7330), y que las células T específicas de VIH son más sensibles a la apoptosis inducida por Fas (Mueller *et al.*, 2001, Immunity, 15:871-882). Appay *et al.* (2002, Nature Med. 8:379-385) examinaron las diferencias entre células T CD8 específicas de VIH, VEB y CMV basándose en la expresión de CD27 y CD28. Células T con diferenciación temprana expresaron tanto CD27 como CD28 y presentaban escasas funciones efectoras pero excelentes capacidades proliferativas. Las células T intermedias fueron positivas para CD27 pero negativas para CD28, y estas células tenían funciones proliferativas y efectoras limitadas. Las células T más diferenciadas carecen tanto de CD27 como de CD28, y estas células tenían escasa capacidad proliferativa pero funciones efectoras potenciadas. Se observó que la mayor parte de las células T específicas de VIH tenían el fenotipo intermedio. Por tanto, el que las células estén "atrapadas" en este fenotipo intermedio de célula T que carece tanto de capacidad proliferativa como de funciones efectoras puede ser el factor contribuyente a la ineficacia de las células T específicas de VIH (Appay *et al.*, 2002, Nature Med. 8, 379-385). Además, la función de las células T CD8 depende enormemente de la función de las células T CD4 (Zajac *et al.*, 1998, J. Exp. Med. 188:2205-2213; Shedlock *et al.*, 2003, Science 300:337-339; Sun *et al.*, 2003, Science 300:339-342) y puesto que el VIH selecciona como diana células T CD4, los defectos de células T CD8 observados en la infección por VIH podrían ser el resultado de una falta de ayuda por las células T.

Los documentos US 2003/224520 A1 y WO 03/057171 A1 se refieren a métodos para activar y expandir células, preferiblemente a un método de activación y estimulación de células usando una plataforma de señalización de longitud múltiple, obtenida por ingeniería genética. Las composiciones de las células activadas y expandidas mediante los métodos se describen adicionalmente. Las células T estimuladas y/o expandidas pueden usarse para fines terapéuticos. El documento US 2003/147869 A1 se refiere a un sistema y a métodos para promover la expansión de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y policlonales en respuesta a células presentadoras de antígeno artificiales. Thomas A. K. *et al.*: "A cell-based artificial antigen-presenting cell coated with anti-CD3 and CD28 antibodies enable rapid expansion and long-term growth of CD4 T lymphocytes", Clinical Immunology, Academic Press, EE.UU. vol. 105, n.º 3, 3 de diciembre de 2002, páginas 259-272 da a conocer la capacidad de dos células mieloides modificadas genéticamente, K562 y U937 para servir como células presentadoras de antígenos

artificiales. Maus M. V. *et al.*: "Ex vivo expansion of policlonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T cell receptor, CD28 and 4-1 BB", Nature Biotechnology, Nature Publishing Group, Nueva York, NY, EE.UU., vol. 20, n.º 2, febrero de 2002, páginas 143-184 da a conocer el cebado *ex vivo* y la expansión de linfocitos T citotóxicos humanos y su potencial para su uso en aplicaciones inmunoterápicas para enfermedades cancerosas e infecciosas.

Por tanto, existe una necesidad sentida desde hace mucho tiempo de proporcionar modos para estimular células T para combatir diversas enfermedades agudas y crónicas y para promulgar números suficientes de células T terapéuticas para inmunoterapia adoptiva. La presente invención satisface esta y otras necesidades.

### Breve resumen de la invención

La presente invención incluye un método *in vitro* de activación o estimulación de células T, comprendiendo el método poner en contacto dichas células T con una célula K562 transducida usando un vector lentiviral que expresa CD64 y 4-1BBL, en el que dicha célula K562 está cargada con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, y en el que la unión de dicho anticuerpo anti-CD3 y dicho anticuerpo anti-CD-218 con dichas células T activa o estimula dichas células T. La presente invención se refiere además a una célula K562 transducida usando un vector lentiviral que expresa CD64 y 4-1BBL, en la que dicha célula K562 está cargada con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, para su uso en la activación o estimulación de células T.

### Breve descripción de los dibujos

Con el fin de ilustrar la invención, se representan en los dibujos determinadas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a las disposiciones e instrumentalidades precisas de las realizaciones representadas en los dibujos.

La figura 1 es un diagrama que ilustra un modelo para la construcción de un sistema de cultivo de células T basado en células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) usando una línea celular eritromieloide humana K562 parental. La figura 1 representa una aAPC K32/4-1BBL modificada por ingeniería que interacciona con una célula T CD8+.

La figura 2, que comprende las figuras 2A a 2C, representa la expansión de células T de memoria centrales específicas de virus influenza (gripe) clasificado por tetrámeros usando aAPC K32/4-1BBL/CD3/28. La figura 2A representa una serie de imágenes que demuestran la clasificación de células T CD8 de un donante HLA-A2 que se había expuesto al virus de la gripe. La figura 2B es un gráfico que demuestra que estas células pudieron mantenerse en cultivo durante 70 días. Se representa el número total de células que se habrían acumulado si no se hubieran desechado células como una representación gráfica semilogarítmica del número de células total frente a los días en cultivo. La figura 2C demuestra un ensayo de liberación de cromo usando células T2 positivas para HLA-A2 deficientes en TAP cargadas o bien con el péptido de la gripe o bien dejándolas sin pulsar en las razones de efector con respecto a diana indicadas.

La figura 3, que comprende las figuras 3A a 3E, ilustra la creación de una aAPC que puede usarse para expandir células T específicas de la gripe. La figura 3 representa una serie de cinco (5) imágenes que demuestran el análisis mediante FACS para cada uno de los marcadores CD32 (figura 3A), KA2 (figura 3B), 4-1BBL (figura 3D) y FluGFP (proteína fluorescente verde, figura 3E) por las aAPC y que representan también un control de isotipo.

La figura 4 es un diagrama que ilustra un modelo experimental que demuestra métodos de expansión de células T CD8 específicas de VIH con una amplia especificidad.

La figura 5 es un gráfico que demuestra que las aAPC basadas en K562 (por ejemplo, K32/CD3/28, K32/86/CD3) median en el crecimiento a largo plazo de células T CD4 y lo hacen de manera más eficaz que las aAPC basadas en U937 (U32/CD3/28) o aAPC basadas en perlas (perlas recubiertas con CD3/28).

La figura 6, que comprende las figuras 6A a 6D, es un gráfico que demuestra la inducción de la expresión de genes coestimuladores y de citocinas en las aAPC basadas en K562 pero no en las aAPC basadas en U937. La figura 6A es un gráfico que representa que el nivel de inducción de interleucina 15 (IL-15) por células K32/CD3/28, K32/CD3, K32, U32/CD3/28, U32/CD3, U32 y T CD4 en reposo. La figura 6B representa la inducción de PD-L1 en las células, que demuestra que las aAPC K32/CD3/28 expresan niveles sustancialmente mayores de PD-L1. La figura 6C es un gráfico que representa la inducción de PD-L2 por diversas aAPC tal como se describió anteriormente. La figura 6D es un gráfico que representa la inducción de B7-H3 por diversas aAPC.

La figura 7 es un diagrama que representa la tasa de crecimiento de aAPC transducidas con lentivirus (LV) cultivadas en medios Aim V (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementados con suero de Ac humano al 3% (Valley Biomedical, Winchester, VA). Se produjeron diversas aAPC basadas en K562 mediante la transducción de K562 parentales (k562cc; rombos oscuros) usando los siguientes constructos de vectores LV: KT32 (1 gen; cuadrados oscuros); KT32/4-1BBL/CD86 (3 genes; triángulos claros); KT32/4-1BBL/CD86/A2/Flu-GFP (5 genes; "X"). Se representa el número total de células que se habrían acumulado si no se hubieran desechado células como una representación gráfica semilogarítmica del número de células total frente a los días en cultivo.

La figura 8, que comprende las figuras 8A a 8E, es un gráfico que representa la coexpresión estable de al menos ocho (8) genes en una única aAPC K562 (8-THREAT). Se transdujeron los siguientes genes en una célula K562 y se expresaron de manera estable, tal como se detectó usando citometría de flujo: Flu-GFP (figura 8A); CD80 (figura 8B); CD86 (figura 8C); 4-1BBL (figura 8D); y HLA ABC (figura 8E).

- 5 La figura 9 es un gráfico que demuestra la expansión a largo plazo de células T CD8 policlonales usando aAPC transducidas con LV.

La figura 10, que comprende las figuras 10A-10E, es una serie de gráficos que demuestran que aAPC K32/4-1BBL expandieron linfocitos citotóxicos (CTL) específicos de hTERT. Las figuras 10A a 10C son gráficos que representan el porcentaje creciente de CTL CD8 tet+ durante la expansión por aAPC K32/4-1BBL. Se indica el momento de la clasificación por MoFlo correspondiente a cada figura 10A-10C en el gráfico que muestra duplicaciones de población (figura 10D). La figura 10D es un gráfico que representa la expansión de CTL específicos de hTERT por las aAPC, mientras que se obtuvieron los CTL de una paciente con cáncer de mama vacunada con hTERT. La figura 10E es un gráfico que demuestra que los CTL específicos de hTERT expandidos usando las aAPC lisan específicamente células de carcinoma que expresan HLA-A2 y telomerasa+ (OV-7) pero no células de carcinoma que son telomerasa+ pero que son HLA-A2-(SK-OV-3).

10  
15

La figura 11, que comprende la figura 11A a la figura 11D, representa datos que comparan la transfección de aAPC usando un plásmido con expresión de moléculas transducidas en una aAPC por lo demás idéntica usando un LV. La figura 11A es un diagrama que representa un LV a modo de ejemplo usado en el presente documento, que representa las modificaciones particulares dadas a conocer en otra parte en el presente documento. Las figuras 11B y 11C representan la eficacia de transducción de células K562 de un único inóculo de virus que expresa GFP (monocistrónico) o mCD8 IRES GFP (bicistrónico). Se midió la expresión en superficie de mCD8 y GFP 5 días después de la transducción.

20

La figura 12, que comprende las figuras 12A a 12F, representa un experimento representativo, en el que se observó que 8.000 células T específicas de antígeno produjeron  $2 \times 10^6$  células después de un mes de cultivo. En resumen, se tiñeron células T purificadas obtenidas de un donante HLA A\*0201, con AcM anti-CD8 y un tetrámero de MHC A\*0201 complejo a un epítipo restringido por A\*0201 de la proteína de la matriz de influenza (tetrámero de MP de virus de la gripe). Se clasificó la población positiva para el tetrámero (aproximadamente 8000 células) y se estimuló con aAPC KTA2/CD32/4-1BBL/FLU GFP irradiadas que se cargaron con anticuerpo anti-CD28. Volvieron a estimularse las células con aAPC KTA2/CD32/4-1BBL/FLU GFP (figuras 12A-D) aproximadamente cada 10-12 días. Se añadió interleucina 2 (IL-2) al cultivo en cada alimentación de células (cada 2-3 días). Las figuras 12E y 12F son gráficos que demuestran la pureza de las células reactivas con el tetrámero de la gripe antes y después de 26 días de expansión. Es decir, se observó una expansión de aproximadamente 250 veces de la población positiva para el tetrámero en estas condiciones de cultivo.

25  
30

La figura 13 es un gráfico de barras que representa el nivel de expresión de citocinas usando una aAPC K562 transducida con CD32 IRES IL-7 (KT32-IL7) y K562 transducida con CD32 IRES IL-15 (KT32-IL15) en las que se clasificaron las células para una alta expresión de CD32.

35

La figura 14 es una representación gráfica que demuestra la expresión estable de CD64 en la superficie de una célula K562 transducida con un vector lentiviral que expresa CD64.

La figura 15 es un gráfico que ilustra el aumento de la capacidad de unión a anticuerpo de células K562 transfectadas con un vector lentiviral que expresa CD64 (células K64).

40

La figura 16 es una serie de gráficos que ilustran que células K64 cargadas con anticuerpo y lavadas múltiples veces son superiores en la estimulación de células T en comparación con K562 células que expresan CD32 (células K32), aunque tanto las células K64 como las células K32 pueden estimular células T.

La figura 17, que comprende las figuras 17A a 17D, es una serie de imágenes que ilustran que se requiere mucha menos cantidad de anticuerpo para cargar de manera óptima células K64 en comparación con células K32. Las figuras 17A y 17B representan células CD4, las figuras 17C y 17D representan células CD8.

45

La figura 18 es un gráfico que ilustra el aumento de la expansión de células Treg estimuladas con células K32 cargadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en comparación con células Treg estimuladas con perlas recubiertas anti-CD3 y anti-CD28.

La figura 19 es un gráfico que representa la capacidad de células Treg para suprimir una reacción linfocitaria mixta (MLR) alogénica.

50

La figura 20 es un gráfico que demuestra que las células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> estimuladas usando células K32 que expresan OX40L vuelven las células Treg no supresoras.

La figura 21, que comprende las figuras 21A a 21C, es una serie de imágenes que ilustran la expansión de células CD8 específicas de antígeno usando K32 cargadas con anticuerpo anti-CD3 y que expresan IL-15, 4-1BBL y CD80.

55

**Descripción detallada de la invención**

La solicitud se refiere al sorprendente descubrimiento de que pueden usarse vectores de lentivirus para producir eficazmente aAPC que expresan de manera estable numerosos ligandos estimuladores y coestimuladores de células T, y anticuerpos de los mismos, así como antígenos, citocinas, entre otras moléculas. La solicitud también se refiere a las aAPC novedosas producidas y a métodos para su uso para expandir una célula T deseada, activar y/o expandir subconjuntos de células T específicos, identificar moléculas estimuladoras, moléculas coestimuladoras, y combinaciones de las mismas, que pueden promover la expansión de subconjuntos de células T específicos, así como numerosos usos terapéuticos relacionados con la expansión y estimulación de células T usando las aAPC novedosas.

Tal como se demuestra por los datos dados a conocer en el presente documento, tras la activación de células T, se secretan factores tales como IFN $\gamma$  que a su vez inducen la expresión de citocinas tales como IL-15 y ligandos coestimuladores tales como B7-H3 en células K562 (Thomas *et al.*, 2002, Clin. Immunol. 105:259-272). El intercambio o "interferencia" entre la aAPC y una célula T es una razón por la que aAPC basadas en células son sistemas de expansión de células T más eficaces que aAPC basadas en perlas. Se diseñan por ingeniería genética células K562 de modo que estas células son un sistema de reemplazo de células dendríticas (DC) "comercialmente disponibles" continuamente renovables. El uso de aAPC obviaría el tiempo y el gasto requeridos para generar DC autóloga como fuente de APC para el cultivo celular. Pueden ser necesarias señales coestimuladoras adicionales para rescatar funciones efectoras de las células T CD8 específicas de VIH y tal como se demuestra por los datos en el presente documento, pueden modificarse células aAPC para expresar tales señales según se desee. De nuevo, esto es una ventaja respecto a sistemas basados en perlas que no abarcan añadir señales coestimuladoras adicionales que pueden requerirse para expandir determinados subconjuntos de células T.

Previamente, se crearon aAPC basadas en células mediante electroporación de células K562 con plásmidos de expresión 4-1BBL y CD32. Usando una combinación de selección de fármacos, clasificación de células y dilución limitante, se aislaron clones de alta expresión (Maus *et al.*, 2002, Nature Biotechnol. 20:143-148). Aunque eficaz, este enfoque requiere mucho tiempo y está limitado por la necesidad de usar marcadores de selección de fármacos. La dependencia de la selección de fármacos restringe el número de constructos que pueden introducirse en células K562 y plantea problemas de cumplimiento con las BPF cuando se contempla el uso clínico.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con el mismo en esta sección.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Tal como se usa en el presente documento, "aliviar" una enfermedad significa reducir la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, los "aminoácidos" se representan mediante el nombre completo de los mismos, por el código de tres letras correspondiente a los mismos, o por el código de una letra correspondiente a los mismos, tal como se indica en la siguiente tabla:

<u>Nombre completo</u>	<u>Código de tres letras</u>	<u>Código de una letra</u>
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H
Tirosina	Tyr	Y
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F

Triptófano

Trp

W

5 “Antisentido” se refiere particularmente a la secuencia de ácido nucleico de la cadena no codificante de una molécula de ADN bicatenario que codifica para una proteína, o a una secuencia que es sustancialmente homóloga a la cadena no codificante. Tal como se define en el presente documento, una secuencia antisentido es complementaria a la secuencia de una molécula de ADN bicatenario que codifica para una proteína. No es necesario que la secuencia antisentido sea complementaria únicamente a la parte codificante de la cadena codificante de la molécula de ADN. La secuencia antisentido puede ser complementaria a secuencias reguladoras especificadas en la cadena codificante de una molécula de ADN que codifica para una proteína, cuyas secuencias reguladoras controlan la expresión de las secuencias codificantes.

10 Por el término “aplicador,” tal como se usa el término en el presente documento, quiere decirse cualquier dispositivo que incluye, pero no se limita a, una jeringa hipodérmica, una pipeta, y similares, para administrar los compuestos y composiciones de la invención.

15 Una “enfermedad” es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis, y en el que si la enfermedad no se mejora, entonces la salud del animal continúa deteriorándose. En cambio, un “trastorno” en un animal es un estado de salud en que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno no provoca necesariamente una disminución adicional en el estado de salud del animal.

20 Por el término “cantidad eficaz”, tal como se usa en el presente documento, quiere decirse una cantidad que cuando se administra a un mamífero, provoca un nivel detectable de respuesta de células T en comparación con la respuesta de células T detectada en ausencia del compuesto. Puede evaluarse fácilmente la respuesta de células T mediante una multitud de métodos reconocidos en la técnica.

25 El experto en la técnica entendería que la cantidad del compuesto o composición administrada en el presente documento varía y puede determinarse fácilmente basándose en varios factores tales como la enfermedad o afección que se trata, la edad y el estado de salud y físico del mamífero que se trata, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular que se administra, y similares.

30 “Material instructivo,” tal como se usa ese término en el presente documento, incluye una publicación, un registro, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que puede usarse para comunicar la utilidad de la composición y/o compuesto de la invención en el kit para lograr aliviar o tratar las diversas enfermedades o trastornos enumerados en el presente documento. Opcional, o alternativamente, el material instructivo puede describir uno o más métodos de aliviar las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido o un mamífero, incluyendo tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento.

35 El material instructivo del kit puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el compuesto y/o composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene el compuesto y/o composición. Alternativamente, el material instructivo puede enviarse por separado del recipiente con la intención de que el destinatario use el material instructivo y el compuesto de manera cooperativa.

Tal como se usa en el presente documento, el término “portador farmacéuticamente aceptable” quiere decir una composición química con la que puede combinarse el principio activo y que, tras la combinación, puede usarse para administrar el principio activo a un sujeto.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término éster o sal “fisiológicamente aceptable” quiere decir un éster o forma de sal del principio activo que es compatible con cualquier otro componente de la composición farmacéutica, que no es perjudicial para el sujeto al que se le va a administrar la composición.

45 Por “complementario a una parte o a todo el ácido nucleico que codifica para” una proteína de la invención, quiere decirse una secuencia de ácido nucleico que no codifica para, por ejemplo, una proteína de ligando coestimuladora. Más bien, la secuencia que se expresa en las células es idéntica a la cadena no codificante del ácido nucleico que codifica para la proteína y por tanto, no codifica para la proteína.

Los términos “complementario” y “antisentido” tal como se usan en el presente documento, no son completamente sinónimos. “Antisentido” se refiere particularmente a la secuencia de ácido nucleico de la cadena no codificante de una molécula de ADN bicatenario que codifica para una proteína, o a una secuencia que es sustancialmente homóloga a la cadena no codificante.

50 “Complementario” tal como se usa en el presente documento se refiere al amplio concepto de complementariedad de secuencia de subunidades entre dos ácidos nucleicos, por ejemplo, dos moléculas de ADN. Cuando se ocupa una posición de nucleótido en ambas moléculas por nucleótidos capaces normalmente de realizar apareamiento de bases entre sí, entonces los ácidos nucleicos se consideran complementarios entre sí en esta posición. Por tanto, dos ácidos nucleicos son complementarios entres sí cuando se ocupa un número sustancial (al menos el 50%) de las posiciones correspondientes en cada una de las moléculas por nucleótidos que normalmente realizan apareamiento de bases entre sí (por ejemplo, pares de nucleótidos A:T y G:C). Tal como se define en el presente

- documento, una secuencia antisentido es complementaria a la secuencia de una molécula de ADN bicatenaio que codifica para una proteína. No es necesario que la secuencia antisentido sea complementaria únicamente a la parte codificante de la cadena codificante de la molécula de ADN. La secuencia antisentido puede ser complementaria a secuencias reguladoras especificadas en la cadena codificante de una molécula de ADN que codifica para una proteína, cuyas secuencias reguladoras controlan la expresión de las secuencias codificantes.
- Una “región codificante” de un gen consiste en los residuos de nucleótidos de la cadena codificante del gen y los nucleótidos de la cadena no codificante del gen que son homólogos con o complementarios a, respectivamente, la región codificante de una molécula de ARNm que se produce mediante transcripción del gen.
- Una “región codificante” de una molécula de ARNm también consiste en los residuos de nucleótidos de la molécula de ARNm que coinciden con una región anticodón de una molécula de ARN de transferencia durante la traducción de la molécula de ARNm o que codifican para un codón de terminación. La región codificante puede, por tanto, incluir residuos de nucleótido correspondientes a residuos de aminoácido que no están presentes en la proteína madura codificada por la molécula de ARNm (por ejemplo, residuos de aminoácido en una secuencia señal de exportación de proteínas).
- “Que codifica para” se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc, o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen o bien una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o bien una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes. Por tanto, un gen codifica para una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona habitualmente en listas de secuencias, como la cadena no codificante, usada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, puede denominarse que codifica para la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.
- A menos que se especifique lo contrario, una “secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican para la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas y ARN pueden incluir intrones.
- “Vector de expresión” se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que va a expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; la célula huésped puede proporcionar otros elementos para la expresión o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adeno-asociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.
- Una primera región de un oligonucleótido “flanquea” una segunda región del oligonucleótido si las dos regiones son adyacentes entre sí o si las dos regiones están separadas por no más de aproximadamente 1000 residuos de nucleótido, y preferiblemente no más de aproximadamente 100 residuos de nucleótido.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento” tal como se aplica a un ácido nucleico, puede ser normalmente de al menos aproximadamente 18 nucleótidos de longitud, preferiblemente, de al menos aproximadamente 24 nucleótidos, más normalmente, de aproximadamente 24 a aproximadamente 50 nucleótidos, preferiblemente, de al menos aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nucleótidos, incluso más preferiblemente, de al menos aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 200 nucleótidos, aún incluso más preferiblemente, de al menos aproximadamente 200 a aproximadamente 300, incluso más preferiblemente, de al menos aproximadamente 300 nucleótidos a aproximadamente 400 nucleótidos, aún incluso más preferiblemente, de al menos aproximadamente 400 a aproximadamente 500, y lo más preferiblemente, el fragmento de ácido nucleico no será mayor de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.
- Tal como se aplica a una proteína, un “fragmento” de una proteína de ligando estimuladora o coestimuladora o un antígeno, es de aproximadamente 6 aminoácidos de longitud. Más preferiblemente, el fragmento de una proteína es de aproximadamente 8 aminoácidos, incluso más preferiblemente, de al menos aproximadamente 10, aún más preferiblemente, de al menos aproximadamente 15, incluso más preferiblemente, de al menos aproximadamente 20, aún más preferiblemente, de al menos aproximadamente 30, incluso más preferiblemente, de aproximadamente 40, y más preferiblemente, de al menos aproximadamente 50, más preferiblemente, de al menos aproximadamente 60, aún más preferiblemente, de al menos aproximadamente 70, incluso más preferiblemente, de al menos aproximadamente 80, y más preferiblemente, de al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud.
- Un “ADN genómico” es una cadena de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga con un gen tal como existe en el huésped natural. A modo de ejemplo, un fragmento de un cromosoma es un ADN genómico.
- “Homólogo” tal como se usa en el presente documento, se refiere a la similitud de secuencias de subunidades entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, dos moléculas de ADN

- o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando se ocupa una posición de subunidad en ambas de las dos moléculas por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si se ocupa una posición en cada una de las dos moléculas de ADN por adenina, entonces son completamente u homólogas en el 100% en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias de compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias son idénticas en el 50%, si el 90% de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, coinciden o son homólogas, las dos secuencias comparten el 90% de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 5'ATTGCC3' y 5'TATGGC3' comparten el 50% de homología.
- Además, cuando se usan los términos “homología” o “identidad” en el presente documento para referirse a los ácidos nucleicos y proteínas, debe interpretarse que se aplica a la homología o identidad en tanto los niveles de ácido nucleico como de secuencia de aminoácidos.
- Un “ácido nucleico aislado” se refiere a un fragmento o segmento de ácido nucleico que se ha separado de secuencias que lo flanquean en un estado que se produce de manera natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha retirado de las secuencias que son normalmente adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que se produce de manera natural. El término también se aplica a ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente a partir de otros componentes que acompañan de manera natural el ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN o proteínas, que los acompañan de manera natural en la célula. El término incluye, por tanto, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un virus o plásmido que se replica de manera autónoma, o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote, o que existe como molécula separada (por ejemplo, como ADNc o fragmento genómico o de ADNc producido mediante PCR o digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica para una secuencia de polipéptido adicional.
- En el contexto de la presente invención, se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácido nucleico que se producen comúnmente. “A” se refiere a adenosina, “C” se refiere a citidina, “G” se refiere a guanosina, “T” se refiere a timidina, y “U” se refiere a uridina.
- Al describir dos polinucleótidos como “unidos operativamente” quiere decirse que un resto de ácido nucleico monocatenario o bicatenario comprende los dos polinucleótidos dispuestos dentro del resto de ácido nucleico de tal manera que al menos uno de los dos polinucleótidos puede ejercer un efecto fisiológico por el cual se caracteriza sobre el otro. A modo de ejemplo, un promotor unido operativamente a la región codificante de un gen puede promover la transcripción de la región codificante.
- Preferiblemente, cuando el ácido nucleico que codifica para la proteína deseada comprende además una secuencia promotora/reguladora, el promotor/regulador se posiciona en el extremo 5' de la secuencia que codifica para una proteína deseada de modo que conduce la expresión de la proteína deseada en una célula. Juntos, el ácido nucleico que codifica para la proteína deseada y su secuencia promotora/reguladora comprenden un “transgén”.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “secuencia promotora/reguladora” quiere decir una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede, por ejemplo, ser una que expresa el producto génico de manera específica de tejido.
- Un promotor “constitutivo” es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica para o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula humana viva en la mayor parte o todas las condiciones fisiológicas de la célula.
- Un promotor “inducible” es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica para o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula humana viva sustancialmente solo cuando un inductor correspondiente al promotor está presente en la célula.
- Un promotor “específico de tejido” es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica para o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula humana viva sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.
- Una “secuencia de poliadenilación” es una secuencia de polinucleótido que dirige la adición de una cola de poli A a una secuencia de ARN mensajero transcrita.
- Un “polinucleótido” quiere decir una cadena sencilla o cadenas paralelas o antiparalelas de un ácido nucleico. Por tanto, un polinucleótido puede ser o bien un ácido nucleico monocatenario o bicatenario.
- El término “ácido nucleico” se refiere normalmente a polinucleótidos grandes.

El término “oligonucleótido” se refiere normalmente a polinucleótidos cortos, generalmente, no mayores de aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando se representa una secuencia de nucleótidos por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que “U” reemplaza a “T.”

- 5 La notación convencional se usa en el presente documento para describir secuencias de polinucleótido: el extremo izquierdo de una secuencia de polinucleótido monocatenaria es el extremo 5'; la dirección izquierda de una secuencia de polinucleótido bicatenaria se denomina dirección 5'.

La dirección de la adición de 5' a 3' de nucleótidos a transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina “cadena codificante”; las secuencias en la cadena de ADN que se sitúan en 5' con respecto a un punto de referencia en el ADN se denominan “secuencias hacia 5'”; las secuencias en la cadena de ADN que están en 3' con respecto a un punto de referencia en el ADN se denominan “secuencias hacia 3'.”

10

Una “parte” de un polinucleótido quiere decir al menos aproximadamente veinte residuos de nucleótido secuenciales del polinucleótido. Se entiende que una parte de un polinucleótido puede incluir cada residuo de nucleótido del polinucleótido.

15

“Cebador” se refiere a un polinucleótido que puede hibridarse específicamente con una plantilla de polinucleótido designada y que proporciona un punto de iniciación para la síntesis de un polinucleótido complementario. Tal síntesis se produce cuando el cebador de polinucleótido se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis, es decir, en presencia de nucleótidos, una plantilla de polinucleótido complementario, y un agente para la polimerización tal como ADN polimerasa. Un cebador es normalmente monocatenario, pero puede ser bicatenario. Los cebadores son normalmente ácidos desoxirribonucleicos, pero una amplia variedad de cebadores sintéticos y que se producen de manera natural son útiles para muchas aplicaciones. Un cebador es complementario a la plantilla con la que está diseñado para hibridarse para servir como sitio para la iniciación de la síntesis, pero no necesita reflejar la secuencia exacta de la plantilla. En tal caso, la hibridación específica del cebador con la plantilla depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores pueden marcarse con, por ejemplo, restos cromogénicos, radiactivos o fluorescentes y usarse como restos detectables.

20

25

“Sonda” se refiere a un polinucleótido que puede hibridarse específicamente con una secuencia designada de otro polinucleótido. Una sonda se hibrida específicamente con un polinucleótido complementario diana, pero no necesita reflejar la secuencia complementaria exacta de la plantilla. En tal caso, la hibridación específica de la sonda con la diana depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Sondas pueden marcarse con, por ejemplo, restos cromogénicos, radiactivos o fluorescentes y usarse como restos detectables.

30

“Polinucleótido recombinante” se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están unidas juntas de manera natural. Puede incluirse un polinucleótido amplificado o ensamblado en un vector adecuado, y puede usarse el vector para transformar una célula huésped adecuada.

- 35 Un polinucleótido recombinante también puede servir para una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión a ribosomas, etc.).

Un “polinucleótido recombinante” es uno que se produce tras la expresión de un polinucleótido recombinante.

“Polipéptido” se refiere a un polímero compuesto por residuos de aminoácido, variantes estructurales que se producen de manera natural relacionadas, y análogos que se producen de manera no natural sintéticos de los mismos unidos mediante enlaces peptídicos, variantes estructurales que se producen de manera natural relacionadas, y análogos que se producen de manera no natural sintéticos de los mismos. Pueden sintetizarse polipéptidos sintéticos, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado.

40

El término “proteína” se refiere normalmente a polipéptidos grandes.

El término “péptido” se refiere normalmente a polipéptidos cortos.

- 45 La notación convencional se usa en el presente documento para representar secuencias de polipéptido: el extremo izquierdo de una secuencia de polipéptido es el extremo amino; el extremo derecho de una secuencia de polipéptido es el extremo carboxilo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gen indicador” quiere decir un gen, la expresión del cual puede detectarse usando un método conocido. A modo de ejemplo, el gen *lacZ* de *Escherichia coli* puede usarse como gen indicador en un medio porque la expresión del gen *lacZ* puede detectarse usando métodos conocidos añadiendo un sustrato cromogénico tal como o-nitrofenil-β-galactósido al medio (Gerhardt *et al.*, eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC, pág. 574).

50

Un “sitio de restricción” es una parte de un ácido nucleico bicatenario que se reconoce por una endonucleasa de restricción.

Un primer oligonucleótido se hibrida con un segundo oligonucleótido “con alta rigurosidad” si los dos oligonucleótidos se hibridan en condiciones por las que sólo los oligonucleótidos que son al menos aproximadamente el 73%, más preferiblemente, de al menos aproximadamente el 75%, incluso más preferiblemente, de al menos aproximadamente el 80%, incluso más preferiblemente, de al menos aproximadamente el 85%, aún más preferiblemente, de al menos aproximadamente el 90%, y lo más preferiblemente, de al menos aproximadamente el 95%, complementarios se hibridan entre sí. La rigurosidad de las condiciones usadas para hibridar dos oligonucleótidos es una función de, entre otros factores, la temperatura, la fuerza iónica del medio de hibridación, el periodo de incubación, la longitud de los oligonucleótidos, el contenido de G-C de los oligonucleótidos, y el grado esperado de no homología entre los dos oligonucleótidos, si se conoce. Se conocen métodos para ajustar la rigurosidad de las condiciones de hibridación (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

Tal como se usa en el presente documento, el término “transgén” quiere decir una secuencia de ácido nucleico exógeno cuyo ácido nucleico exógeno se codifica por un mamífero o célula transgénica.

Una “célula recombinante” es una célula que comprende un transgén. Tal célula puede ser una célula eucariota o una célula procariota. Además, la célula transgénica abarca, pero no se limita a, una aAPC, una célula madre embrionaria que comprende el transgén, una célula obtenida de un mamífero quimérico derivado de una célula ES transgénica en la que la célula comprende el transgén, una célula obtenida de un mamífero transgénico, o tejido fetal o placentario del mismo, y una célula procariota que comprende el transgén.

Por el término “ácido nucleico exógeno” quiere decirse que el ácido nucleico se ha introducido en una célula o un animal usando tecnología que se ha desarrollado con el fin de facilitar la introducción de un ácido nucleico en una célula o un animal.

Por polipéptido de “etiqueta” quiere decirse cualquier proteína que, cuando se une por un péptido a una proteína de interés, puede usarse para localizar la proteína, para purificarla a partir de un extracto celular, para inmovilizarla para su uso en ensayos de unión, o para de otro modo estudiar sus propiedades biológicas y/o función.

Tal como se usa en el presente documento, “tratar” quiere decir reducir la frecuencia con la que un paciente experimenta los síntomas de una enfermedad (es decir, infección vírica, crecimiento tumoral y/o metástasis, u otro efecto mediado por números disminuidos y/o actividad disminuida de células T, y similares).

Por el término “vector” tal como se usa en el presente documento, quiere decirse cualquier plásmido o virus que codifica para un ácido nucleico exógeno. El término debe también interpretarse como que incluye compuestos no plásmidos y no víricos que facilitan la transferencia de ácido nucleico en viriones o células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina y similares. El vector puede ser un vector vírico que es adecuado como vehículo de administración para la administración de un ácido nucleico que codifica para una proteína y/o anticuerpo de la invención, al paciente, o a la aAPC, o el vector puede ser un vector no vírico que es adecuado para el mismo fin.

Se conocen bien ejemplos de vectores víricos y no víricos para la administración de ADN a células y tejidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ma *et al.* (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12744-12746). Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero no se limitan a, un vector lentiviral, un adenovirus recombinante, un retrovirus recombinante, un virus adeno-asociado recombinante, un virus de viruela aviar recombinante, y similares (Cranage *et al.*, 1986, EMBO J. 5:3057-3063; solicitud de patente internacional n.º WO94/17810, publicada el 18 de agosto de 1994; solicitud de patente internacional n.º WO94/23744, publicada el 27 de octubre de 1994). Los ejemplos de vectores no víricos incluyen, pero no se limitan a, liposomas, derivados de poliamina de ADN, y similares.

Un tratamiento “terapéutico” es un tratamiento administrado a un paciente que presenta signos de patología con el fin de disminuir o eliminar esos signos y/o disminuir la frecuencia, duración e intensidad de los signos.

Una “cantidad eficaz” de un compuesto es la cantidad de una célula (por ejemplo, una aAPC o célula T estimulada y/o expandida de ese modo) que es suficiente para proporcionar un efecto detectable a una población de células T, o a un mamífero, a la que la aAPC se administra y/o se pone en contacto con cuando se compara con una población de células T por lo demás idéntica, o mamífero, a la que no se administra la aAPC, o célula T expandida de ese modo.

El experto en la técnica entendería que la cantidad eficaz varía y puede determinarse fácilmente basándose en varios factores tales como la enfermedad o afección que se trata, la edad y estado de salud y físico del mamífero que se trata, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular o célula que se administra, el nivel de actividad o expresión de la célula aAPC o T expandida de ese modo, y similares. Generalmente, la cantidad eficaz se establecerá entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg y 25 mg/kg. El compuesto o célula (por ejemplo, una citocina, un ligando o molécula estimuladora de la misma, un ligando o molécula coestimuladora de la misma, un anticuerpo que se une específicamente con un ligando, un ácido nucleico que codifica para tales proteínas, una aAPC, una célula T expandida de ese modo, y similares) puede administrarse a través de inyección intravenosa, o administrarse a un sitio de tumor, e incluye, entre otras cosas, una inyección en bolo. Sin embargo, la invención no se limita a este, o cualquier otro, método de administración.

Un tratamiento “terapéutico” es un tratamiento administrado a un paciente que presenta signos de patología con el fin de disminuir o eliminar esos signos y/o decrecer o disminuir la frecuencia, duración e intensidad de los signos.

5 Por el término “estimulación,” quiere decirse una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando afín mediante de ese modo un evento de transducción de señal, tal como, pero sin limitarse a, transducción de señal mediante el complejo de TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de determinadas moléculas, tales como regulación por disminución de TGF- $\beta$ , y/o reorganización de estructuras del citoesqueleto, y similares.

10 “Activación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al estado de una célula T que se ha estimulado suficientemente para una inducir proliferación celular detectable. La activación también puede asociarse con producción de citocina inducida, y funciones efectoras detectables. El término “células T activadas” se refiere a, entre otras cosas, células T que están experimentando división celular.

15 Por el término “se une específicamente,” tal como se usa en el presente documento, quiere decirse un anticuerpo, o un ligando, que reconoce y se une con una proteína (por ejemplo, una molécula estimuladora y/o coestimuladora presente en una célula T) de pareja de unión afín presente en una muestra, pero que el anticuerpo o ligando no reconoce o se une sustancialmente a otras moléculas en la muestra.

20 Un “ligando estimulador,” tal como se usa en el presente documento, quiere decir un ligando que cuando está presente en una célula que presenta antígeno (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, una célula B, y similares) puede unirse específicamente con una pareja de unión afín (denominada en el presente documento “molécula estimuladora”) en una célula T, mediando de ese modo una respuesta primaria por la célula T, que incluye, pero no se limita a, activación, iniciación de una respuesta inmunitaria, proliferación, y similares. Se conocen bien en la técnica ligandos estimuladores y abarcan, entre otros, una molécula de MHC de clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 superagonista, y un anticuerpo anti-CD2 superagonista.

25 Una “molécula estimuladora,” tal como se usa el término en el presente documento, quiere decir una molécula en una célula T que se une específicamente con un ligando estimulador afín presente en una célula que presenta antígeno (por ejemplo, una aAPC de la invención, entre otros).

“Cargada” con un péptido, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una presentación de un antígeno en el contexto de una molécula de MHC. “Cargada” tal como se usa en el presente documento también quiere decir la unión de un anticuerpo a un receptor de unión a Fc en una célula, tal como CD32 y/o CD64.

30 “Ligando coestimulador,” tal como se usa el término en el presente documento, incluye una molécula en una célula que presenta antígeno (por ejemplo, una aAPC, célula dendrítica, célula B, y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora afín en una célula T, proporcionando así una señal que, además de la señal primaria proporcionada por, por ejemplo, la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, media un respuesta de células T, que incluye, pero no se limita a, proliferación, activación, diferenciación, y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero no se limita a, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une al receptor de ligando tipo Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora presente en una célula T, tal como, pero sin limitarse a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83.

45 Una “molécula coestimuladora” se refiere a la pareja de unión afín en una célula T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de ese modo la célula T una respuesta coestimuladora, tal como, pero sin limitarse a, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a una molécula de MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando tipo Toll.

50 “Anticuerpo superagonista,” tal como se usa en el presente documento, quiere decir un anticuerpo que se une específicamente con una molécula en una célula T y puede mediar un evento de señal de activación primaria en una célula T sin interacción del complejo TCR/CD3 o CD2 en la célula T. Tal anticuerpo superagonista incluye, pero no se limita a, un anticuerpo anti-CD3 superagonista, un anticuerpo anti-CD28 superagonista, y un anticuerpo anti-CD2 superagonista.

A menos que se refiera como “superagonista”, un anticuerpo anti-CD2, un anticuerpo anti-CD28, y similares, es un ligando coestimulador tal como se define en otra parte en el presente documento, y proporciona una señal coestimuladora en vez de una señal de activación primaria.

55 “Tratar” una enfermedad tal como se usa el término en el presente documento, quiere decir reducir la frecuencia de la enfermedad o trastorno reduciendo la frecuencia con la que un paciente experimenta un síntoma del uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno.

Por el término “vacuna” tal como se usa en el presente documento, quiere decirse una composición, una proteína o un ácido nucleico que codifica para una proteína, o una aAPC de la invención, que sirve para proteger un animal frente a una enfermedad y/o para tratar un animal ya afectado por una enfermedad induciendo una respuesta inmunitaria, en comparación con un animal de otro modo idéntico al que no se le administra la vacuna o en comparación con el animal antes de la administración de la vacuna.

“Inmunovacuna,” tal como se usa en el presente documento, quiere decirse una aAPC que puede provocar una respuesta inmunitaria detectable cuando se administra a un animal. Más preferiblemente, una inmunovacuna es una aAPC que estimula y activa células T cuando se administra al animal, de modo que genera una respuesta inmunitaria de células T a un patógeno, una célula tumoral, y similares, cuando se compara con una célula T la respuesta inmunitaria, si existe, en un animal de otro modo idéntico al que no se le administra la inmunovacuna.

#### Descripción

La invención se refiere al sorprendente hallazgo de que una línea celular eritromieloide humana, K562, que no expresa moléculas de MHC de clase I o clase II, y que se creía previamente que era resistente a las técnicas de manipulación genéticas, puede transducirse fácilmente usando vectores de lentivirus para expresar numerosas moléculas, que incluye, pero no se limita a, ligandos estimuladores, ligando coestimuladores, antígenos (por ejemplo, tumoral, vírico, y similares), citocinas, etc.

Además, los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que varios (al menos nueve) ácidos nucleicos exógenos que expresan varias proteínas pueden introducirse fácilmente y expresarse en estas células, pero que el nivel de expresión de las proteínas es mayor que el logrado usando sistemas de expresión basados en plásmido y la expresión es estable y continúa durante muchos meses disminución detectable. Además, la célula presentadora de antígeno artificial basada en K562 (aAPC), que no expresa moléculas de CHM de clase I o II, puede transducirse con y las expresa fácilmente. De manera notable, aAPC transducida con un ácido nucleico que codifica para un antígeno de interés procesó el antígeno y lo presentó adecuadamente a una célula T produciendo de ese modo células T específicas de antígeno sin necesidad de identificar el epítipo reconocido por la célula T. De manera sorprendente, tal como se demuestra por los datos dados a conocer en el presente documento, la célula aAPC se procesó adecuadamente y presentó el antígeno descrito anteriormente..

#### I. Composiciones

Se da a conocer una célula presentadora de antígeno artificial aislada (aAPC), en la que la célula comprende una célula K562 transducida usando un vector lentiviral (LV). Además, el LV codifica para al menos un ligando estimulador inmunitario y coestimulador. Aunque los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que aproximadamente nueve ácidos nucleicos que codifican para aproximadamente nueve moléculas transducidas diferentes en una célula K562 se expresaron altamente y de manera estable en cultivo a largo plazo, no hay nada que sugiera que esto es un límite del número o las clases de moléculas que pueden introducirse en estas células. En su lugar, puede introducirse cualquier molécula o ligando, ya sea estimulador, coestimulador, citocina, antígeno, receptor de Fc $\gamma$ , y similares, en estas células para producir una aAPC de la invención.

El experto en la técnica apreciará, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que pueden usarse numerosas moléculas inmunorreguladoras para producir una variedad casi ilimitada de aAPC una vez dotado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Es decir, existen conocimientos extensos en la técnica referentes a los eventos y las moléculas implicadas en la activación e inducción de célula T, y tratados que comentan respuestas inmunitarias mediadas por células T, y los factores que median en las mismas, se conocen bien en la técnica. Existe una extensa divulgación proporcionada en los documentos WO 03/057171 y US2003/0147869. Más específicamente, una señal primaria, habitualmente mediada a través del complejo receptor de células T/CD3 en una célula T, inicia el proceso de activación de células T. Adicionalmente, numerosas moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de una célula T están implicadas en la regulación de la transición de célula T en reposo a proliferación celular. Tales moléculas coestimuladoras, también denominadas “coestimuladores”, que se unen específicamente con sus ligandos respectivos, incluyen, pero no se limitan a, CD28 (que se une con B7-1 [CD80], B7-2 [CD86]), PD-1 (que se une con los ligandos PD-L1 y PD-L2), B7-H3, 4-1BB (se une al ligando 4-1BBL), OX40 (se une al ligando OX40L), ICOS (se une al ligando ICOS-L) y LFA (se une al ligando ICAM). Por tanto, la señal estimuladora primaria media en la estimulación de células T, pero la señal coestimuladora se requiere entonces para la activación de células T, tal como se demuestra mediante proliferación.

Por tanto, la aAPC dada a conocer es una célula que comprende un ligando estimulador que se une específicamente con un complejo de TCR/CD3 de tal manera que se transduce una señal primaria. Adicionalmente, tal como apreciará un experto en la técnica, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, la aAPC comprende además al menos un ligando coestimulador que se une específicamente con al menos una molécula coestimuladora presente en una célula T, molécula coestimuladora que incluye, pero no se limita a, CD27, CD28, CD30, CD7, un ligando que se une específicamente con CD83, 4-1BB, PD-1, OX40, ICOS, LFA-1, CD30L, NKG2C, B7-H3, MHC de clase I, BTLA, receptor de ligando tipo Toll y LIGHT. Esto se debe a que, tal como se comentó previamente y tal como se demuestra mediante los datos dados a conocer en otra parte en el presente documento, se requiere una señal coestimuladora para inducir la activación de células T y la proliferación asociada.

En la invención están englobados otros ligandos coestimuladores, tal como entenderá un experto en la técnica dotado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Tales ligandos incluyen, pero no se limitan a, un mutante, una variante, un fragmento y un homólogo de los ligandos naturales descritos previamente.

5 Estos y otros ligandos se conocen bien en la técnica y se han caracterizado bien tal como se describe, por ejemplo, en Schwartz *et al.*, 2001, Nature 410:604-608; Schwartz *et al.*, 2002, Nature Immunol. 3:427-434; y Zhang *et al.*, 2004, Immunity. 20:337-347. Usando los extensos conocimientos en la técnica referentes al ligando, el experto en la técnica, dotado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento apreciará que también se describe un mutante o una variante del ligando y puede transducirse en una célula usando un LV para producir la aAPC y tales mutantes y variantes se comentan de manera más detallada en otra parte en el presente documento.

10 Por tanto, la aAPC dada a conocer comprende al menos un ligando estimulador y al menos un ligando coestimulador, de tal manera que la aAPC puede estimular y expandir una célula T que comprende una molécula estimuladora pareja de unión relacionada que se une específicamente con el ligando estimulador en la aAPC y una molécula coestimuladora pareja de unión relacionada que se une específicamente con el ligando coestimulador en la aAPC de tal manera que la interacción entre los ligandos en la aAPC y las moléculas correspondientes en la célula T median, entre otras cosas, en la proliferación de células T, expansión y respuesta inmunitaria según se desee. Un experto en la técnica apreciará que cuando se conocen las moléculas estimuladoras y coestimuladoras particulares en una célula T de interés, puede producirse fácilmente una aAPC de la invención para expandir esa célula T. A la inversa, cuando no se conocen las moléculas estimuladoras y coestimuladoras en una célula T de interés, puede usarse un panel de aAPC para determinar qué moléculas, y combinaciones de las mismas, pueden expandir esa célula T. Por tanto, se proporcionan herramientas para la expansión de células T deseadas, así como herramientas para elucidar las moléculas en células T particulares que median en la activación y proliferación de células T.

20 El experto en la técnica entenderá que los ácidos nucleicos engloban una secuencia de ARN o de ADN que codifica para una proteína de la invención, y cualquier forma modificada de las mismas, incluyendo químicas modificaciones del ADN o ARN que hacen que la secuencia de nucleótidos sea más estable cuando está libre de células o cuando se asocia con una célula. También pueden usarse modificaciones químicas de nucleótidos para potenciar la eficacia con la que se capta una secuencia de nucleótidos por una célula o la eficacia con la que se expresa en una célula. En el presente documento se contemplan todas y cada una de las combinaciones de modificaciones de las secuencias de nucleótidos.

25 Además, puede usarse un número cualquiera de procedimientos para la generación de formas mutantes, derivadas o variantes de una proteína usando una metodología de ADN recombinante que se conoce bien en la técnica tal como, por ejemplo, la descrita en Sambrook y Russell (2001, Molecular Cloning, A Laboratory Approach, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY), y Ausubel *et al.* (2002, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY). Los procedimientos para la introducción de cambios de aminoácidos en una proteína o un polipéptido alterando la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido se conocen bien en la técnica y también se describen en estos tratados, y otros.

30 Además se describe un ácido nucleico que codifica para un ligando coestimulador, o antígeno, en el que un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de etiqueta se une covalentemente al mismo. Es decir, se describe un ácido nucleico quimérico en el que las secuencias de ácido nucleico que codifican para un polipéptido de etiqueta se unen covalentemente al ácido nucleico que codifica para al menos una proteína de la invención, o fragmento biológicamente activo de la misma. Tales polipéptidos de etiqueta se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), un polipéptido de etiqueta de hemaglutinina del virus influenza, un polipéptido de etiqueta del virus del herpes, myc, myc-piruvato cinasa (myc-PK), His6, proteína de unión a maltosa (MBP), un polipéptido de etiqueta FLAG y un polipéptido de etiqueta de glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, la invención no debe considerarse en modo alguna limitada a los ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos de etiqueta enumerados anteriormente. Más bien, debe considerarse que en el presente documento se da a conocer cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido que puede funcionar de una manera sustancialmente similar a estos polipéptidos de etiqueta.

35 El ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de etiqueta puede usarse para localizar una proteína, o un fragmento biológicamente activo de la misma, dentro de una célula, un tejido y/o un organismo completo (por ejemplo, un ser humano, y similares), y para estudiar el/los papel(es) de la proteína en una célula. Además, la adición de un polipéptido de etiqueta facilita el aislamiento y la purificación de la proteína "etiquetada" de tal manera que las proteínas pueden producirse y purificarse fácilmente. De manera más importante, tal como se demuestra en otra parte en el presente documento, la expresión de un ligando coestimulador que comprende una etiqueta permite la detección de la expresión del ligando, y además permite el aislamiento de células que expresan el ligando usando muchos métodos, incluyendo, pero sin limitarse a, clasificación de células.

40 También se describen análogos de proteínas o péptidos que comprenden un ligando coestimulador tal como se da a conocer en el presente documento. Los análogos pueden diferir de proteínas o péptidos que se producen de manera natural en diferencias conservativas de la secuencia de aminoácidos o en modificaciones que no afectan a la secuencia, o en ambas. Por ejemplo, pueden realizarse cambios de aminoácidos conservativos, que aunque alteran la secuencia primaria de la proteína o el péptido, normalmente no alteran su función. Las sustituciones de

aminoácidos conservativas incluyen normalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos:

glicina, alanina;

valina, isoleucina, leucina;

ácido aspártico, ácido glutámico;

5 asparagina, glutamina;

serina, treonina;

lisina, arginina;

fenilalanina, tirosina.

10 Las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluyen, *in vivo* o *in vitro*, derivatización química de polipéptidos, por ejemplo, acetilación o carboxilación.

También se incluyen modificaciones de glicosilación, por ejemplo, las realizadas modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, exponiendo el polipéptido a enzimas que afectan a la glicosilación, por ejemplo, enzimas de glicosilación o desglucosilación de mamíferos. También se abarcan secuencias que tienen residuos de aminoácido fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

También se incluyen polipéptidos que se han modificado usando técnicas habituales de biología molecular de modo que mejore su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar propiedades de solubilidad o para volverlos más adecuados como agente terapéutico. Los análogos de tales polipéptidos incluyen los que contienen residuos distintos de los L-aminoácidos que se producen de manera natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos que no se producen de manera natural. Los péptidos de la invención no se limitan a productos de cualquiera de los procesos a modo de ejemplo específicos enumerados en el presente documento.

25 La solicitud también engloba "mutantes", "derivados" y "variantes" de los péptidos (o del ADN que codifica para los mismos) mutantes, derivados y variantes que son ligandos coestimuladores, citocinas, antígenos (por ejemplo, célula tumoral, viral, y otros antígenos), que están alterados en uno o más aminoácidos (o, cuando se hace referencia a la secuencia de nucleótidos que codifica para los mismos, están alterados en uno o más pares de bases) de tal manera que el péptido (o ADN) resultante no es idéntico a las secuencias citadas en el presente documento, pero tiene las mismas propiedades biológicas que los péptidos dados a conocer en el presente documento, porque el péptido tiene las propiedades biológicas/bioquímicas de un ligando coestimulador, citocina, antígeno, y similares, de la presente invención (por ejemplo, expresión por una aAPC cuando se pone en contacto la aAPC que expresa la proteína con una célula T, media en la proliferación de, o afecta de otro modo a, la célula T).

Entre una "actividad biológica", tal como se usa en el presente documento, se incluye un ligando coestimulador que cuando se transduce en una célula K562 se expresa y, cuando la célula se pone en contacto con una célula T que expresa una molécula coestimuladora relacionada en su superficie, media en la activación y estimulación de la célula T, con proliferación inducida.

35 En efecto, se describe un potente ensayo de examen novedoso para la identificación de mutantes, variantes, fragmentos y homólogos de ligandos coestimuladores en el que una posible forma novedosa de un ligando coestimulador puede transducirse y expresarse en la aAPC de la invención. La capacidad de la aAPC para estimular y/o activar una célula T puede evaluarse y compararse con la capacidad de una aAPC que comprende el ligando coestimulador silvestre o "natural" para estimular y/o activar una célula T idéntica por lo demás. De este modo, pueden identificarse, aislarse y caracterizarse fácilmente variantes funcionales, que demuestran la capacidad para activar/estimular la célula T en mayor, menor o igual medida que el ligando silvestre de control. Tales variantes novedosas de ligandos coestimuladores son posibles herramientas de investigación para la elucidación de procesos de células T, y también proporcionan importante terapéutica potencial basándose en la inhibición o inducción de la activación/estimulación de células T, tal como, pero sin limitarse a, la administración de una variante con actividad inhibidora que puede competir con el ligando natural para inhibir respuestas de células T no deseadas tales como, pero sin limitarse a, rechazo de trasplantes. A la inversa, puede usarse una variante que demuestra mayor actividad como ligando coestimulador para aumentar una respuesta de células T deseada, tal como, pero sin limitarse a, administración a un paciente inmunosuprimido. Por ejemplo, puede modificarse por ingeniería una ligando variante a modo de ejemplo para ser más eficaz que el ligando natural o para favorecer la unión de una molécula coestimuladora positiva (CD28) a expensas de un regulador negativo (CTLA-4). Estas y muchas otras variaciones están englobadas en la invención.

Un experto en la técnica apreciará, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que un ligando coestimulador engloba un anticuerpo que se une específicamente con la molécula coestimuladora presente en una célula T con la que también se une el ligando. Es decir, la invención engloba una aAPC que comprende no

sólo un ligando coestimulador (por ejemplo, CD80 y CD86, entre otros) que se une a una molécula coestimuladora en una célula T (por ejemplo, CD28), sino que también engloba al menos un anticuerpo que se une específicamente con la molécula coestimuladora (por ejemplo, anti-CD28). Numerosos anticuerpos contra las moléculas coestimuladoras están disponibles actualmente, o pueden producirse siguiendo procedimientos que se conocen bien en la técnica.

El experto en la técnica entenderá, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que puede producirse una aAPC que comprende un anticuerpo, tal como se ejemplifica en otra parte en el presente documento, introduciendo un ácido nucleico que codifica para CD32, el receptor de Fc $\gamma$  humano, en la aAPC. Además, tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento, una aAPC que se une a un anticuerpo, tal como un anticuerpo contra CD3 o un anticuerpo contra CD28, puede producirse expresando un ácido nucleico que codifica para CD64 en la aAPC. CD64 es el receptor Fc $\gamma$ RI humano de alta afinidad. Las CD32 y/o CD64 expresadas en la superficie de la aAPC entonces pueden "cargarse" con cualquier anticuerpo deseado que se une con CD32 y/o CD64, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpo que se une específicamente con CD3 y anticuerpo que se une específicamente con CD28. Además, se da a conocer una aAPC en la que un ácido nucleico que codifica para el ligando de anticuerpo de interés, quizás unido a una secuencia IRES, se transduce y expresa en la superficie de la aAPC eliminando de ese modo la necesidad de expresión de CD32 y/o CD64 y la carga de las mismas. Por tanto, se da a conocer una aAPC transducida con un ácido nucleico que codifica para al menos un anticuerpo que se une específicamente con CD3, CD28, PD-1, B7-H3, 4-1BB, OX40, ICOS, CD30, HLA-DR, MHCII, receptor de ligando de tipo Toll y LFA, entre otros, así como una aAPC transducida con CD32 y/o CD64 y cargada con al menos un anticuerpo que se une específicamente con las moléculas mencionadas anteriormente.

Además, se engloba una aAPC en la que el ligando coestimulador es una pareja de unión relacionada que se une específicamente con una molécula coestimuladora, así como en la que el ligando es un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora, y cualquier combinación de los mismos, de tal manera que una única aAPC puede comprender tanto ácidos nucleicos que codifican para ligandos coestimuladores y/o como anticuerpos específicos para moléculas coestimuladoras presentes en la célula T, y cualquier combinación de los mismos.

También se engloba una aAPC que comprende un ácido nucleico que codifica para un antígeno de interés. Una enorme variedad de antígenos se incluyen, tal como, pero sin limitarse a, antígenos tumorales, por ejemplo, telomerasa, antígeno de melanoma reconocido por células T (MART-1), genes que codifican para antígeno de melanoma, 1, 2 y 3 (MAGE-1, -2, -3), GP100 de melanoma, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer de mama HER-2/Neu, antígeno prostático específico sérico (PSA), tumor de Wilm 1 (WT-1), antígenos de mucina (MUC-1, 2, 3, 4) e idiotipos de linfoma de células B. Esto se debe a que, tal como se demuestra mediante los datos dados a conocer en otra parte en el presente documento, las aAPC basadas en K562 que comprenden un antígeno, pueden procesar y presentar el antígeno en el contexto de MHC (en el que la célula también se transduce con un ácido nucleico que codifica para una molécula de MHC de clase I o clase II) produciendo de ese modo células T específicas de antígeno y expandiendo una población de las mismas. Los datos dados a conocer demuestran que se produjeron CTL específicos de hTERT expandiendo células T hTERT+ usando una aAPC transducida con CD32 y 4-1BBL (K32/4-1BBL). Por tanto, pueden usarse las aAPC para expandir y producir suficientes células T específicas de antígeno con el fin de administrar las células T a un paciente que lo necesita, proporcionando por tanto un tratamiento de inmunovacuna dirigido contra células tumorales que portan el antígeno. Por tanto, un antígeno de interés puede introducirse en una aAPC de la invención, en la que la aAPC presenta entonces el antígeno en el contexto del complejo MHC de clase I o II, es decir, la molécula de MHC se "carga" con el antígeno, y la aAPC puede usarse para producir una célula T específica de antígeno.

De manera similar, también puede transducirse y expresarse un antígeno viral, o cualquier otro patógeno, por la aAPC. Los datos dados a conocer en otra parte en el presente documento demuestran que las células T positivas para proteína de matriz (tetrámero de MP de la gripe) clasificadas y estimuladas con células aAPC irradiadas (K2/CD3/4-1BBL/FLU-GFP) cargadas con anticuerpo anti-CD28 expandieron las células T proporcionando grandes números de CTL específicos de antígeno, específicos para el antígeno viral. Estos datos demuestran que las aAPC de la invención pueden usarse para expandir y producir células T específicas de antígeno que van a usarse para tratar infecciones virales, y otras patógenas.

Adicionalmente, la solicitud engloba una aAPC transducida con un ácido nucleico que codifica para al menos una citocina, al menos una quimiocina, o ambas. Esto se debe a que los datos dados a conocer en otra parte en el presente documento demuestran ampliamente que una aAPC transducida con un ácido nucleico que codifica para una interleucina (por ejemplo, IL-7, IL-15, y similares) expresó de manera estable la interleucina. Además, usando un vector LV que comprende un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), puede secretarse la interleucina a partir de las aAPC (por ejemplo, una célula K562 transducida con un vector LV tal como, pero sin limitarse a, pCLPS CD32-IRES-IL-7, -12, -15, -18 y -21). Otras citocinas que puede expresarse por aAPC incluyen, pero no se limitan a, interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), SLC, IL-2, IL-4, IL-23, IL-27 y similares. La invención incluye además, pero no se limita a, quimiocina RANTES, MIP-1a, MIP-1b, SDF-1, eotaxina, y similares.

Por tanto, la solicitud engloba una citocina, incluyendo una citocina de longitud completa, fragmento, homólogo, variante o mutante de la citocina. Una citocina incluye una proteína que puede afectar a la función biológica de otra

célula. Una función biológica afectada por una citocina puede incluir, pero no se limita a, crecimiento celular, diferenciación celular o muerte celular. Preferiblemente, una citocina dada a conocer puede unirse a un receptor específico en la superficie de una célula, afectando de ese modo a la función biológica de una célula.

5 Una citocina preferida incluye, entre otros, un factor de crecimiento hematopoyético, una interleucina, un interferón, una molécula de la superfamilia de inmunoglobulinas, una molécula de la familia del factor de necrosis tumoral y/o una quimiocina. Una citocina más preferida incluye un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), factor de necrosis tumoral beta ( $TNF\beta$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), interleucina-15 (IL-15), interleucina-21 (IL-21),  
10 interferón alfa ( $IFN\alpha$ ), interferón beta ( $IFN\beta$ ), interferón gamma ( $IFN\gamma$ ) e IGIF, entre muchos otros.

Una quimiocina, incluyendo un homólogo, variante, mutante o fragmento de la misma, engloba una alfa-quimiocina o una beta-quimiocina, incluyendo, pero sin limitarse a, una C5a, interleucina-8 (IL-8), proteína quimiotáctica de monocitos 1 alfa ( $MIP1\alpha$ ), proteína quimiotáctica de monocitos 1 beta ( $MIP1\beta$ ), proteína quimioatrayente de monocitos I (MCP-1), proteína quimioatrayente de monocitos 3 (MCP-3), factor de activación de plaquetas (PAFR), N-formil-metionil-leucil- $^{3}H$ ]fenilalanina (FMLPR), leucotrieno B4 (LTB4R), péptido de liberación de gastrina (GRP), RANTES, eotaxina, linfotactina, IP10, I-309, ENA78, GCP-2, NAP-2 y/o MGSA/gro. Un experto en la técnica apreciará, una vez dotado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que la invención engloba una quimiocina y una citocina, tal como se conocen bien en la técnica, así como cualquiera descubierta en el futuro.

El experto en la técnica apreciará, una vez dotado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que la aAPC no se limita en modo alguno a ningún antígeno, citocina, ligando coestimulador, anticuerpo que se une específicamente a molécula coestimuladora particular, y similares. Más bien, la invención engloba una aAPC que comprende numerosas moléculas, o bien expresadas todas bajo el control de una única secuencia promotora/reguladora o bien bajo el control de más de una de tales secuencias. Además, la solicitud engloba la administración de una o más aAPC dadas a conocer en el que las diversas aAPC codifican para diferentes moléculas. Es decir, las diversas moléculas (por ejemplo, ligandos coestimuladores, antígenos, citocinas, y similares) pueden actuar en *cis* (es decir, en la misma aAPC y/o codificadas por el mismo ácido nucleico contiguo o en moléculas de ácido nucleico independientes dentro de la misma aAPC) o en *trans* (es decir, las diversas moléculas se expresan por diferentes aAPC).

De este modo, tal como entenderá un experto en la técnica, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, la dosis y el momento de administración de los medicamentos que comprenden las aAPC pueden adaptarse específicamente para cada aplicación. Más específicamente, cuando se desea proporcionar estimulación a una célula T usando determinadas moléculas expresadas por una aAPC, o varias aAPC, seguido por estimulación usando otra aAPC, o varias aAPC, que expresa un conjunto de moléculas diferente, aunque solapante, entonces puede utilizarse combinación de enfoques en *cis* y *trans*. En esencia, las aAPC dadas a conocer, y los métodos dados a conocer en el presente documento, proporcionan un número casi ilimitado de variaciones. El experto en la técnica, dotado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento y los conocimientos disponibles en la técnica, puede determinar fácilmente el enfoque deseado para cada célula T particular. Alternativamente, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que proporciona métodos para evaluar la eficacia de los métodos de estimulación y expansión de células T dados a conocer en el presente documento, el experto en la técnica puede determinar qué enfoque(s) puede aplicar a las células T particulares que van a expandirse o estimularse.

El experto en la técnica entenderá, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que pueden estar favorecidas diversas combinaciones de moléculas que van a expresarse en las aAPC dadas a conocer. Aunque se indican varias de estas combinaciones de moléculas en toda la memoria descriptiva, incluyendo, pero sin limitarse a, las combinaciones ejemplificadas en las tablas 1, 2, 3 y 4. Más bien, un experto en la técnica apreciará, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que una amplia variedad de combinaciones de moléculas puede transducirse en una célula para producir la aAPC de la invención. Las moléculas engloban las conocidas en la técnica, tales como las comentadas en el presente documento, así como las moléculas que se descubrirán en el futuro.

La solicitud engloba la preparación y el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden una aAPC de la invención como principio activo. Una composición farmacéutica de este tipo puede consistir en el principio activo solo, como combinación de al menos un principio activo (por ejemplo, una dosis eficaz de una APC) en una forma adecuada para la administración a un sujeto, o la composición farmacéutica puede comprender el principio activo y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, uno o más componentes adicionales (activos y/o inactivos), o alguna combinación de estos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" significa una composición química con la que puede combinarse el principio activo y que, tras la combinación, puede usarse para administrar el principio activo a un sujeto.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse

mediante cualquier método conocido o desarrollado a partir de ahora en la técnica de la farmacología. En general, tales métodos preparatorios incluyen la etapa de poner el principio activo en asociación con un portador o uno o más de otros componentes auxiliares, y entonces, si es necesario o deseable, conformar o envasar el producto en una unidad de dosis única o múltiples deseada.

5 Aunque las descripciones de composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración ética a seres humanos, el experto en la técnica entenderá que tales composiciones son generalmente adecuadas para la administración a animales de todas clases. La modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de volver las composiciones adecuadas para la administración a diversos animales se entiende bien, y el farmacólogo veterinario experto habitual puede diseñar y realizar tal modificación con experimentación meramente habitual, si la requiere. Los sujetos para los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas dadas a conocer incluyen, pero no se limitan a, seres humanos y otros primates, mamíferos incluyendo mamíferos comercialmente relevantes tales como primates no humanos, ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos y perros, aves incluyendo aves comercialmente relevantes tales como pollos, patos, ocas y pavos, peces incluyendo peces de piscifactoría y peces de acuarios, y crustáceos tales como marisco de criaderos.

10 Pueden prepararse composiciones farmacéuticas que son útiles en los métodos de la invención, envasarse o venderse en formulaciones adecuadas para la administración por vía oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, pulmonar, intranasal, intralesional, bucal, oftálmica, intravenosa, intraorgánica u otra vía de administración. Otras formulaciones contempladas incluyen nanopartículas proyectadas, preparaciones liposomales, eritrocitos resellados que contienen el principio activo y formulaciones de base inmunológica.

15 Una composición farmacéutica, puede prepararse, envasarse o venderse a granel, como una unidad de dosis única, o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Tal como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad diferenciada de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo es generalmente igual a la dosificación del principio activo que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de tal dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o una tercera parte de tal dosificación.

20 Las cantidades relativas del principio activo, el portador farmacéuticamente aceptable, y cualquier componente adicional en una composición farmacéutica de la invención variarán, dependiendo de la identidad, el tamaño y el estado del sujeto tratado y dependiendo además de la vía mediante la que va a administrarse la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre el 0,1% y el 100% (p/p) de principio activo.

25 Además del principio activo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. Los agentes adicionales contemplados particularmente incluyen antieméticos y eliminadores tales como eliminadores de cianuro y cianato y AZT, inhibidores de proteasa, inhibidores de transcriptasa inversa, interleucina-2, interferones, citocinas, y similares.

30 Pueden prepararse formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición farmacéutica de la invención usando tecnología convencional.

35 Tal como se usa en el presente documento, "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la formación de una brecha física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la brecha en el tejido. Por tanto, la administración parenteral incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica penetrante de tejido, y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluya, pero no se limite a, técnicas de inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, e infusión de diálisis renal.

40 Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral comprenden el principio activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Tales formulaciones pueden prepararse, envasarse o venderse en una forma adecuada para la administración en bolo o para administración continua. Pueden prepararse formulaciones inyectables, envasarse o venderse en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en envases de múltiples dosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, disoluciones, emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, pastas y formulaciones biodegradables o de liberación sostenida implantables. Tales formulaciones pueden comprender además uno o más componentes adicionales incluyendo, pero sin limitarse a, agentes de suspensión, estabilización o dispersión.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o venderse en forma de una suspensión o disolución acuosa o aceitosa inyectable estéril. Esta suspensión o disolución puede formularse según la técnica conocida, y puede comprender, además del principio activo, componentes adicionales tales como los agentes de dispersión, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en el presente documento. Tales formulaciones inyectables estériles pueden prepararse usando un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral, no tóxico, tal

como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero no se limitan a, solución de Ringer, disolución isotónica de cloruro de sodio y aceite fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones que pueden administrarse por vía parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal, o como componente de un sistema de polímero biodegradable. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero moderadamente soluble o una sal moderadamente soluble.

La aAPC de la invención y/o células T expandidas usando la aAPC, pueden administrarse a un animal, preferiblemente un ser humano. Cuando se administran las células T expandidas usando una aAPC de la invención, la cantidad de células administradas puede oscilar entre aproximadamente 1 millón de células y aproximadamente 300 mil millones. Cuando se administran las propias aAPC, o bien con o bien sin células T expandidas por las mismas, pueden administrarse en una cantidad que oscila entre aproximadamente 100.000 y aproximadamente mil millones de células en las que las células se infunden en el animal, preferiblemente, un paciente humano que lo necesita. Aunque la dosificación precisa administrada variará dependiendo de cualquier número de factores, incluyendo pero sin limitarse a, el tipo de animal y el tipo de estado patológico que esté tratándose, la edad del animal y la vía de administración.

La aAPC puede administrarse a un animal de manera tan frecuente como varias veces al día, o puede administrarse con menos frecuencia, tal como una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso con menos frecuencia, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis resultará evidente para el experto en la técnica y dependerá de cualquier número de factores, tales como, pero sin limitarse a, el tipo y la gravedad de la enfermedad que esté tratándose, el tipo y la edad del animal, etc.

Una aAPC (o células expandidas por la misma) puede coadministrarse con los diversos otros compuestos (citocinas, fármacos quimioterápicos y/o antivirales, entre muchos otros). Alternativamente, el/los compuesto(s) puede(n) administrarse una hora, un día, una semana, un mes, o incluso más, con antelación a la aAPC (o células expandidas por la misma), o cualquier permutación de los mismos. Además, el/los compuesto(s) puede(n) administrarse una hora, un día, una semana, o incluso más, después de la administración de aAPC (o células expandidas por la misma), o cualquier permutación de los mismos. La frecuencia y el régimen de administración resultarán fácilmente evidentes para el experto en la técnica y dependerán de cualquier número de factores tales como, pero sin limitarse a, el tipo y la gravedad de la enfermedad que esté tratándose, la edad y el estado de salud del animal, la identidad del compuesto o compuestos que estén administrándose, la vía de administración de los diversos compuestos y la aAPC (o células expandidas por la misma), y similares.

Además, un experto en la técnica apreciará, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que cuando la aAPC va a administrarse a un mamífero, las células se tratan de modo que están en un "estado de no crecimiento"; es decir, las células no pueden dividirse cuando se administran a un mamífero. Tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento, las células pueden irradiarse para hacer que no puedan crecer o dividirse una vez que se administran a un mamífero. Se conocen en la técnica otros métodos, incluyendo haptización (por ejemplo, usando dinitrofenilo y otros compuestos), para hacer que las células que van a administrarse, especialmente a un ser humano, no puedan crecer y estos métodos no se comentan adicionalmente en el presente documento. Además, se ha establecido la seguridad de la administración de aAPC que se ha hecho que no puedan dividirse *in vivo* en ensayos clínicos de fase I usando aAPC transfectadas con vectores de plásmido que codifican para algunas de las moléculas comentadas en el presente documento.

## II. Métodos

La solicitud engloba un método para inducir específicamente la proliferación de una célula T que expresa una molécula coestimuladora conocida. El método comprende poner en contacto una célula T que va a expandirse con una aAPC que comprende un vector de lentivirus que codifica para un ligando que se une específicamente con esa molécula coestimuladora. Tal como se demuestra en otra parte en el presente documento, poner en contacto una célula T con una aAPC basada en K562 que comprende, entre otras cosas, un ligando coestimulador que se une específicamente a una molécula coestimuladora relacionada expresada en la superficie de la célula T, estimula la célula T e induce la proliferación de células T de tal manera que pueden producirse fácilmente grandes números de células T específicas. La aAPC expande la célula T "específicamente" porque sólo las células T que expresan la molécula coestimuladora particular se expanden por la aAPC. Por tanto, cuando la célula T que va a expandirse está presente en una mezcla de células, algunas o la mayoría de las cuales no expresan la molécula coestimuladora, sólo se inducirá la célula T de interés para que prolifere y se expanda en el número de células. La célula T puede purificarse además usando una amplia variedad de técnicas de separación y purificación celular, tales como las conocidas en la técnica y/o descritas en otra parte en el presente documento.

Tal como apreciará el experto en la técnica, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, no es necesario identificar o aislar la célula T de interés antes de la expansión usando la aAPC. Esto se debe a que la aAPC es selectiva y sólo expandirá la(s) célula(s) T que expresa(n) la molécula coestimuladora relacionada.

Preferiblemente, se logra la expansión de determinadas células T usando varias aAPC o una única aAPC, que expresan diversas moléculas, incluyendo, pero sin limitarse a, un antígeno, una citocina, un ligando coestimulador, un ligando de anticuerpo que se une específicamente con la molécula coestimuladora presente en la célula T. Tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento, la aAPC puede comprender un ácido nucleico que codifica para CD32 y/o CD64 de tal manera que la CD32 y/o la CD64 expresadas en la superficie de aAPC pueden “cargarse” con cualquier anticuerpo deseado siempre que se unan a CD32 y/o CD64, que son receptores de Fc $\gamma$ . Esto hace que la aAPC “disponible comercialmente” se adapte fácilmente para estimular cualquier célula T deseada.

La solicitud engloba un método para inducir específicamente la proliferación de una célula T que expresa una molécula coestimuladora conocida. El método comprende poner en contacto una población de células T que comprende al menos una célula T que expresa la molécula coestimuladora conocida con una aAPC que comprende un LV que codifica para un ligando de la molécula coestimuladora. Tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento, cuando una aAPC expresa al menos un ligando coestimulador que se une específicamente con una molécula coestimuladora en una célula T, la unión de la molécula coestimuladora con su ligando coestimulador relacionado induce la proliferación de la célula T. Por tanto, se induce que prolifere la célula T de interés sin tener que purificar primero la célula de la población de células. Además, este método proporciona un ensayo rápido para determinar si cualquier célula en la población va a expresar una molécula coestimuladora particular de interés, puesto que poner en contacto las células con la aAPC inducirá la proliferación y detección de las células en crecimiento, identificando de ese modo que una célula T que expresa una molécula coestimuladora de interés estaba presente en la muestra. De este modo, puede expandirse y aislarse cualquier célula T de interés en la que se conoce al menos una molécula coestimuladora en la superficie de la célula.

La invención incluye un método para expandir específicamente un subconjunto de la población de células T, concretamente el método de la reivindicación 1. Tal como se demostró previamente en otra parte en el presente documento, la unión de la molécula coestimuladora con su ligando coestimulador pareja de unión induce la proliferación de la célula T, expandiendo de ese modo específicamente un subconjunto de la población de células T. Un experto en la técnica entenderá, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que los subconjuntos de células T incluyen células T cooperadoras (T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub>) CD4 que expresan, linfocito T citotóxicos (CTL) (Tc1 o Tc2), células T reguladoras (T<sub>REG</sub>), T<sub>C/S</sub>, vírgenes, de memoria, de memoria centrales, de memoria efectoras y células  $\gamma\delta$ T. Por tanto, pueden producirse fácilmente poblaciones celulares enriquecidas para un subconjunto de células T particular usando el método de la invención.

La solicitud también incluye un método para identificar un ligando coestimulador, o una combinación del mismo, que induce específicamente la activación de un subconjunto de células T. En resumen, el método comprende poner en contacto una población de células T con una aAPC que comprende un LV que codifica por al menos un ligando coestimulador, y comparar el nivel de proliferación del subconjunto de células T puesto en contacto con la aAPC con el nivel de proliferación de un subconjunto de células T por lo demás idéntico no puesto en contacto con la aAPC. Un mayor nivel de proliferación del subconjunto de células T puesto en contacto con la aAPC en comparación con el nivel de proliferación del subconjunto de células T por lo demás idéntico que no se puso en contacto con la aAPC es una indicación de que el ligando coestimulador induce específicamente la activación del subconjunto de células T al que pertenece la célula T.

El método permite la identificación de un ligando coestimulador que expande específicamente un subconjunto de células T cuando no se conocía previamente qué factor(es) expande(n) ese subconjunto de células T. El experto en la técnica apreciará que con el fin de minimizar el número de exámenes, se prefieren transducir tantos ácidos nucleicos que codifican para ligandos coestimuladores de tal manera que pueda reducirse el número de ensayos. Además, el método permite, combinando las diversas proteínas (por ejemplo, ligando estimulator, ligando coestimulador, antígeno, citocina, y similares), evaluar qué combinación/combinaciones de factores producirán la aAPC más eficaz, o una combinación de aAPC, para expandir el subconjunto de células T. De este modo, pueden examinarse los diversos requisitos para el crecimiento y la activación para cada subconjunto de células T.

En un aspecto, el método comprende poner en contacto diversas aAPC con el subconjunto de células T sin caracterizar primero las moléculas coestimuladoras en la superficie del subconjunto de células T. Además, la invención engloba un método en el que la(s) molécula(s) coestimuladora(s) presente(s) en la superficie del subconjunto de células T se examina(n) antes de poner en contacto las aAPC con la célula. Por tanto, la presente invención proporciona un ensayo novedoso para determinar los requisitos de crecimiento para diversos subconjuntos de células T.

La solicitud engloba un método para inducir una respuesta de células T frente a un antígeno en un mamífero. El método comprende administrar una aAPC que induce específicamente la proliferación de una célula T específica para el antígeno. Una vez que se obtienen números suficientes de células T específicas de antígeno usando la aAPC para expandir la célula T, las células T específicas de antígeno así obtenidas se administran al mamífero según los métodos dados a conocer en otra parte en el presente documento, induciendo de ese modo una respuesta de células T al antígeno en el mamífero. Esto es porque, tal como se demuestra por los datos dados a conocer en el presente documento, las células T específicas de antígeno pueden producirse fácilmente estimulando células T en reposo usando la aAPC de la invención.

La solicitud engloba un método para inducir una respuesta de células T frente a un antígeno en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método obtener una población de células del mamífero, en el que la población comprende células T, poner en contacto las células T con una aAPC que presenta el antígeno en el contexto de un complejo de MHC, en el que poner en contacto las células T con la aAPC induce la proliferación de células T específicas para el antígeno. Las células T específicas de antígeno se administran al mamífero, induciendo de ese modo una respuesta de células T frente al antígeno en el animal que lo necesita. Tal como se estableció previamente en otra parte en el presente documento, los datos dados a conocer en otra parte demuestran ampliamente que pueden producirse fácilmente CTL específicos de antígeno poniendo en contacto una célula T con una aAPC en la que la aAPC presenta el antígeno en el contexto de un complejo MHC. Tal como se indicó previamente en otra parte en el presente documento, puede usarse una amplia variedad de aAPC, que comprenden numerosas combinaciones de diversas moléculas (ligandos coestimuladores, anticuerpos, antígenos, MHC, y similares), para determinar el método óptimo para expandir las células T específicas de antígeno para la administración a un mamífero que lo necesita.

### III. Kits

La solicitud incluye diversos kits que comprenden una aAPC de la invención, un ácido nucleico que codifica para diversas proteínas, un anticuerpo que se une específicamente a una molécula coestimuladora en la superficie de una célula T y/o un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo de la invención, un antígeno o una citocina, un aplicador y materiales de instrucciones que describen el uso del kit para realizar los métodos de la invención. Aunque se describen a continuación kits a modo de ejemplo, el contenido de otros kits útiles resultará evidente para el experto en la técnica a la luz de la presente divulgación. Cada uno de estos kit está incluido dentro de la invención.

La solicitud incluye un kit para inducir específicamente la proliferación de una célula T que expresa una molécula coestimuladora conocida. Esto se debe a que poner en contacto la célula T con una aAPC, induce específicamente la proliferación de la célula T. El kit se usa según los métodos dados a conocer en la invención. En resumen, el kit puede usarse para administrar una aAPC de la invención a una célula T que expresa al menos una molécula coestimuladora. Esto se debe a que, tal como se da a conocer de manera más detallada en otra parte en el presente documento, los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que poner en contacto una célula T con una aAPC que comprende un ligando coestimulador que se une específicamente con la molécula coestimuladora relacionada presente en la célula T, media en la estimulación y activación de la célula T. Además, las células T producidas usando este kit pueden administrarse a un animal para lograr resultados terapéuticos.

El kit comprende además un aplicador útil para administrar la aAPC a las células T. El aplicador particular incluido en el kit dependerá, por ejemplo, del método usado para administrar la aAPC, así como de las células T expandidas por la aAPC, y tales aplicadores se conocen bien en la técnica y pueden incluir, entre otras cosas, una pipeta, una jeringa, un cuentagotas, y similares. Además, el kit comprende un material de instrucciones para el uso del kit. Estas instrucciones simplemente realizan la divulgación proporcionada en el presente documento.

El kit incluye un portador farmacéuticamente aceptable. La composición se proporciona en una cantidad apropiada tal como se expone en otra parte en el presente documento. Además, la vía de administración y la frecuencia de administración son tal como se expusieron previamente en otra parte en el presente documento.

El kit engloba una aAPC que comprende una multitud de moléculas, tales como, pero sin limitarse a las expuestas en las tablas 1, 2, 3 y 4 en otra parte en el presente documento. Sin embargo, el experto dotado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, apreciará fácilmente que la solicitud no se limita en modo alguno a esta o cualquier otra combinación de moléculas. En cambio, las combinaciones expuestas en el presente documento son para fines ilustrativos y no limitan en modo alguno las combinaciones englobadas por la presente invención. Además, el kit comprende un kit en el que cada molécula que va a transducirse a la aAPC se proporciona como un ácido nucleico aislado que codifica para una molécula, un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una molécula, y cualquier combinación de los mismos, incluyendo cuando al menos dos moléculas se codifican por un ácido nucleico contiguo y/o se codifican por el mismo vector. El experto habitual entenderá que la solicitud engloba una multitud de constructos que codifican para las moléculas de interés que van a introducirse en una aAPC de la invención.

La solicitud se describe además en detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines de ilustración, y no pretenden ser limitativos a menos que se especifique de otro modo. Por tanto, no debe considerarse en modo alguno que la invención se limita a los ejemplos siguientes, sino que más bien debe considerarse que engloba todas y cada una de las variaciones que se harán evidentes como resultado de las enseñanzas facilitadas en el presente documento.

### 55 Ejemplos

#### Ejemplo 1: Desarrollo de células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) basadas en células para inmunoterapia adoptiva

Se ha demostrado que los requisitos de crecimiento intrínsecos de células T CD4 y CD8 difieren (Deets *et al.*, 1997,

Eur. J. Immunol. 27:598-608; Laux *et al.*, 2000, Clin. Immunol. 96:187-197; Foulds *et al.*, 2002, J. Immunol. 168:1528-1532). Se diseñó una aAPC basada en células para permitir la manipulación genética de la expresión de diferentes moléculas coestimulantes además de CD28 para el crecimiento a largo plazo de células CD8. El sistema de cultivo se basó en el hecho de que se requieren señales coestimulantes, además de las proporcionadas por CD28, para un crecimiento óptimo de células CD8. Se usó la línea celular de LMC eritromieloide humana K562 (Lozzio *et al.*, 1975, Blood 45:321-334) como base para las aAPC celulares, porque esta línea celular no expresa proteínas HLA que fomentarán las respuestas alógenas. Sin embargo, las células K562 sí que expresan ICAM (CD54) y LFA-3 (CD58), ambas de las cuales fomentan interacciones con células T (figura 1). Otras ventajas de usar células K562 incluyen el, pero no se limitan al, hecho de que células K562 irradiadas pueden introducirse en el entorno clínico ya que estas células están libres de micoplasma, se propagan en medio libre de suero y se destruyen fácilmente por linfocitos citolíticos naturales (NK). A pesar de que resulta deseable usar células K562 para producir tales aAPC, las células K562 han sido notoriamente difíciles de transducir (Kahl *et al.*, 2004, J. Virol. 78:1421). Sorprendentemente, los datos dados a conocer en el presente documento demuestran, por primera vez, que pueden transducirse células K562, en serie y/o en paralelo, con una amplia cantidad de ácidos nucleicos exógenos para expresar varias moléculas obteniendo así una biblioteca de aAPC con fenotipos deseados. Tal transducción basada en LV se realiza en serie y/o en paralelo, y se usa MoFlo para clonar células que demuestran un fenotipo deseado. Además, los datos demuestran que puede seleccionarse un promotor óptimo y puede evaluarse la competición de promotor y eliminarse si es necesario o se desea. Después se evalúa la biblioteca de aAPC producidas usando los métodos de la invención para determinar la función biológica *in vivo*, usando un modelo reconocido en la técnica, tal como, pero sin limitarse a, un modelo de ratón NOD/SCID.

Con respecto al uso de células K562 para producir aAPC, se mencionan las divulgaciones de la solicitud de patente estadounidense n.º 10/336.135 (ahora publicada como publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US2003/0147869A1) y la solicitud de patente internacional n.º PCT/US03/00339 (ahora publicada como publicación internacional n.º WO 03/057171A2).

#### 25 Producción de vectores lentivirales

Para evitar las limitaciones de enfoques basados en transfección anteriormente descritos para introducir genes en células K562, se usó una serie de vectores lentivirales de alto título, tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento, para introducir de manera estable una amplia red de ligandos coestimulantes y moléculas de MHC en células K562. Esto permite la producción rápida y sistemática de una variedad de aAPC y permite la determinación de la combinación de moléculas coestimulantes que proporciona las funciones efectoras y de expansión óptimas a células T específicas de VIH. Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran este enfoque.

Como ejemplo no limitativo, una aAPC puede comprender algunos o todos de los ligandos, entre otras cosas, descritos en el presente documento. Estos diversos constructos se usan para transducir las células K562 usando LV. Estos son meramente a modo de ejemplo y la invención no se limita a estos constructos, o cualquier otro constructo particular, para la transducción de las aAPC de la invención con una molécula conocida de interés que va a expresarse en las células.

CD32: Se produjo una aAPC transducida con LV que comprende CD32 usando CD32 (SEQ ID NO: 8) amplificado a partir de ADNc preparado a partir de ARN de neutrófilos. En resumen, se aislaron los neutrófilos mediante gradiente de Ficoll a partir de un producto de aféresis obtenido de un donante anónimo normal. Se clonó este producto de PCR en pcDNA3.1 mediante sitios de restricción de Kpn I y Not I que se añadieron a los extremos de cada cebador de amplificación. Se digirió este vector con XbaI y Sal I y se clonó en pCLPS (Parry *et al.*, 2003, J. Immunol. 171:166-174) para crear pCLPS/CD32. Se obtuvo sobrenadante que contenía vector lentiviral en alto título recogiendo células 293T transfectadas que se habían transfectado usando un método de transfección de genoma dividido tal como se describe en Dull *et al.* (1998, J. Virol. 72:8463-8471) y Parry *et al.* (2003, J. Immunol. 171:166-174).

IL-7: Se produjo una aAPC que comprendía IL7 usando ácido nucleico de IL-7 (SEQ ID NO: 9) amplificado a partir de ADNc y clonado en pcDNA3.1/higromicina. Se realizó SOE mediante PCR (que consistió en tres reacciones independientes) usando cebadores diseñados con 5'-CD32-XbaI y 3'-IL-7-SalI. Los moldes adicionales usados durante la reacción incluyeron CD32-pcDNA3.1 y pCLPS/m8h28-IRES-YFP seguido por digestión con enzimas de restricción de los productos de PCR para producir CD32-IRES-IL-7/pCLPS. Se preparó el lentivirus tal como se describió anteriormente en otra parte en el presente documento.

IL-15: Se usó plásmido pYAX/Hum-IL-15 (que comprende SEQ ID NO: 10), que comprende un péptido líder de IgE unido a una secuencia de IL-15 madura. Se diseñaron cebadores de PCR para añadir sitios de restricción de MluI y SalI a la secuencia de plásmido. Se digirió el producto de PCR con las enzimas respectivas y se clonó en CD32-IRES-IL-7/pCLPS (que también se cortó con MluI y SalI para eliminar el gen de IL-7). Se preparó el lentivirus tal como se describe en el presente documento.

IL-21: Se amplificó IL-21 (SEQ ID NO: 11) a partir de PBMC humanas activadas y se clonó en el vector TOPO 3 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Usando BamHI y XhoI, se escindió el gen de IL-21 humano del vector y después se clonó

el inserto en la primera posición del constructo NKG2D-IRES-DAP12/pCLPS (que se produjo usando BamHI y XhoI). Se amplificó CD32 humano a partir de CD32-pCLPS (tal como se describió anteriormente) usando cebadores de PCR que flanqueaban los extremos que comprendían sitios de MluI y Sall. Se digirió el producto de PCR con las enzimas respectivas y se clonó en la segunda posición para crear IL21-IRES-CD32/pCLPS. Se produjo el lentivirus tal como se describió anteriormente en otra parte en el presente documento.

OX40L: Se amplificó OX40L (SEQ ID NO: 12) a partir de ADNc obtenido a partir de células dendríticas maduras (Schlienger *et al.*, 2000, Blood) y se clonó en pcDNA3.1/higromicina. Se añadieron sitios de enzimas de restricción MluI y Sall a los extremos de cebadores de PCR y se digirió el producto de PCR con las enzimas respectivas y se clonó en CD32-IRES-IL-7/pCLPS, que también se cortó con MluI y Sall para eliminar el inserto de IL-7. Se preparó el vector lentiviral CD32-IRES-OX40L/pCLPS tal como se describió anteriormente en otra parte en el presente documento.

4-1BBL: Se amplificó 4-1BBL (SEQ ID NO: 13) a partir de ADNc obtenido a partir de células B activadas que se purificaron mediante selección negativa tal como se describió anteriormente, y activándose las células con PMA e ionomicina. El producto de PCR en el que se introdujeron sitios de Kpn I y NotI en los extremos, se clonó en pcDNA3.1/higromicina digerido con KpnI/Not I. Se digirió el vector con XbaI y Sal I y se clonó en vector lentiviral pCLPS digerido con XbaI/Sal I. Se preparó el vector lentiviral pCLPS/4-1BBL tal como se describió anteriormente en otra parte en el presente documento.

CD80: Se amplificó CD80 (SEQ ID NO: 14) a partir de ADNc obtenido a partir de una línea de células B inmortalizadas (Vonderheide *et al.*, 1999, Immunity 10:673-679) usando cebadores de PCR que introdujeron sitios de BamHI y Sall en los extremos del producto de PCR. Tras la digestión con estas enzimas, se clonó CD80 en vector lentiviral pCLPS digerido con BamHI/Sall. Se produjo vector lentiviral CD80-pCLPS tal como se describió anteriormente en otra parte en el presente documento.

CD83: Se amplificó CD83 (SEQ ID NO: 15) a partir de ADNc preparado a partir de la línea celular Ramesh, usando cebadores para introducir sitios de restricción de XbaI y XhoI en los extremos del producto de PCR. Tras la digestión con estas enzimas, se ligó producto de PCR de CD83 en pCLPS (digerido con XbaI/Sall). Se produjo el vector lentiviral CD83-pCLPS tal como se describió anteriormente en otra parte en el presente documento.

CD86: Se amplificó CD86 (SEQ ID NO: 16) a partir de ADNc obtenido a partir de células dendríticas maduras (que se prepararon tal como se describe en Schlienger *et al.*, 2000, Blood) usando cebadores de PCR que tenían sitios de restricción de BamHI y Not I en los extremos. Se digirió el producto de PCR con BamHI y Not I y se ligó en pcDNA3.1/higromicina digerido de manera similar. Se digirió este vector con BamHI y Sal I y se clonó en pCLPS. Se produjo el vector lentiviral pCLPS/CD86 tal como se describió anteriormente en otra parte en el presente documento.

ICOS-L: Se amplificó ICOS-L (SEQ ID NO: 17) usando cebadores de PCR que comprendían sitios de restricción de Kpn I y Not I en los extremos, usando ADNc obtenido a partir de células dendríticas. Se clonó el producto de PCR en pcDNA3.1/higromicina digerido con KpnI y Not I. Se digirió el plásmido con BamHI y Xho I para escindir el inserto de ICOS-L que se clonó en pCLPS (digerido con BamHI/XhoI) para generar ICOS-L-pCLPS. Se produjo el vector lentiviral tal como se describió anteriormente en otra parte en el presente documento.

HLA-A\*0201: Se obtuvo clon de ADNc de HLA-A\*0201 a partir de The International Cell and Gene Bank, que está disponible para el público a partir del sitio web de la organización International Histocompatibility Working Group (ihwg.org) en los recursos compartidos de banco de células y de genes (cbankover). Se amplificó HLA-A\*0201 mediante PCR usando cebadores que comprendían sitios de restricción de Bam HI y Sal en los extremos y se clonó el producto de amplificación en pCLPS. Se produjo el vector lentiviral pCLPS/HLA-A2 tal como se describió anteriormente en otra parte en el presente documento.

Flu-GFP: Se usó un vector de fusión Flu-GFP que comprendía toda la región que codifica para la proteína fluorescente verde potenciada (BD Biosciences, Palo Alto, CA) fusionada con los nucleótidos 113-290 de la proteína de matriz de la gripe 1 (SEQ ID NO: 18). Se digirió este constructo con BamHI y Xho I y se clonó en pCLPS digerido con Bam HI y Sal I. Se produjo el vector lentiviral pCLPS/GFP-Flu tal como se describió anteriormente en otra parte en el presente documento.

DR $\alpha$ : Se clonaron DR $\alpha$  (SEQ ID NO: 19) y DRB4 (SEQ ID NO: 20) usando ADNc obtenido a partir de células T CD4 activadas con CD3/28 usando técnicas convencionales y se clonó cada ácido nucleico en pCLPS. Para producir células K562 que expresaban DR4, se transdujeron simultáneamente ambos vectores en células K562 y HLA-DR y se aislaron células que expresaban DR4 usando citometría de flujo tal como se describe en otra parte en el presente documento.

Además, se expresaron ILT3 (SEQ ID NO: 21) y ILT4 (SEQ ID NO: 22) en la aAPC divulgada esencialmente según métodos dados a conocer en otra parte en el presente documento y conocidos en la técnica.

Se usaron vectores lentivirales (LV) de tercera generación, de alta eficacia y de alto título para producir eficazmente aAPC. Estos vectores tienen varias características de seguridad incorporadas que hacen que estén adecuados de manera ideal para productos terapéuticos para seres humanos. De manera específica, aproximadamente el 90% de

- las secuencias de VIH-1 se han retirado del vector de transferencia dejando sólo las secuencias de empaquetamiento y de integración físicamente unidas al gen de carga útil. Se generan LV empaquetados incompetentes para la replicación usando un enfoque de genoma dividido. Específicamente, se transfectan células 293T con cuatro plásmidos independientes que codifican para gag/pol de VIH, proteína G de VEV (env), rev de VIH y el vector de transferencia. Se produjeron vectores lentivirales tras la transfección de células HEK 293T cultivadas en RPMI 1640 (BioWhittaker, Inc. Rockville MD), FCS al 10%, glutamina 2 mM y penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 µg/ml. Se sembraron células a  $5 \times 10^6$  por matraz de cultivo tisular T150 24 horas antes de la transfección. Se purificó dos veces todo el ADN de plásmido usando un gradiente de CsCl. Se transfectaron células con 7 µg de pMDG.1 (envuelta G de VEV), 18 µg de pRSV.rev (plásmido que codifica para Rev de VIH-1), 18 µg de pMDLg/p.RRE (plásmido de empaquetamiento) y 15 µg de plásmido de transferencia de pCLS usando Fugene 6 (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). Se cambiaron los medios 6 horas tras la transfección y se recogió el sobrenadante viral a las 24 horas y a las 48 horas tras la transfección. Se concentraron las partículas virales 10 veces mediante ultracentrifugación durante 3 horas a 28.000 RPM con un rotor Beckmann SW28 tal como se describe en Reiser (2000, Gene Ther. 7:910-913).
- Como resultado de esta estrategia, tendrían que producirse tres acontecimientos de recombinación independientes y altamente improbables para crear un vector competente para la replicación. Como precaución de seguridad adicional, se hizo que este vector se volviera autoinactivante eliminando el promotor 3'LTR (Zufferey *et al.*, 1998, J. Virol. 72:9873-9880). Por tanto, tras la integración el único promotor funcional es el promotor interno suministrado (en este caso, CMV) yuxtapuesto con el gen de carga útil y por tanto no se transcribe ninguna secuencia de VIH.
- Usando este enfoque de transducción de vector lentiviral, se han creado varios vectores lentivirales de alto título para aAPC CD83 e ICOS-L y KA2/32/86/4-1BBL y se ha creado la célula KA2/32/86 parental (figura 3), así como otras aAPC descritas en otra parte en el presente documento. En resumen, se transdujeron células K562 con vectores de expresión lentivirales que codificaban para CD32, HLA-A2, 4-1BBL y una proteína de fusión MP1GFP de influenza, se clasificaron para detectar clones individuales que expresaban los cuatro marcadores y se expandieron durante cuatro semanas (figura 3). Además, se ha producido (P) o se ha diseñado (D) una amplia variedad de vectores lentivirales, que comprenden numerosas combinaciones de moléculas útiles para la transducción de aAPC basadas en células K562, tal como se expone en la tabla 1.

TABLA 1

pCLPS/CD32 (P)	pCLPS/siRNA-PD-L1 (D)
pCLPS/CD32/IRES/GM-GCSF (D)	pCLPS/siRNA-B7-H3 (D)
pCLPS/CD32/IRES/IL-7 (P)	pCLPS/siRNA-TGFbeta (D)
pCLPS/CD32/IRES/IL-12 (D)	pCLPS/IDO (D)
pCLPS/CD32/IRES/IL-15 (P)	pCLPS/GFP-flu matrix (P)
pCLPS/CD32/IRES/IL-18 (D)	pCLPS/GFP/IRES/pol (P)
pCLPS/CD32/IRES/IL-21 (P)	pCLPS/HLA DR0101 (D)
pCLPS/CD32/IRES/Interferon alpha (D)	pCLPS/HLA A201 (P)
pCLPS/CD32/SLC (D)	pCLPS/ICOSL (P)
pCLPS/CD30L (D)	pCLPS/CD86 (P)
pCLPS/OX40L (P)	pCLPS/CD83 (P)
pCLPS/4-1BBL (P)	pCLPS/CD80 (P)
pCLPS/GITRL (D)	pCLPS/CD70 (D)
pCLPS/CD40 (D)	

#### Células K562

- Se aislaron células K562 a partir de un paciente con leucemia mielógena crónica en crisis hemoblástica terminal (Lozzio *et al.*, 1975, Blood 45:321-334). Las células K562 pueden representar un precursor de DC que no expresa moléculas de MHC o ligandos coestimulantes de células T, pero conserva muchos otros atributos que hacen que las DC sean APC eficaces, tales como, pero sin limitarse a, producción de citocinas, expresión de moléculas de adhesión y macropinocitosis. Estos atributos pueden ser únicos para células K562, ya que la línea celular monocítica U-937 no pudo funcionar como aAPC eficaz. Por tanto, las células K562 representan bases ideales sobre las que pueden introducirse las moléculas de MHC y los ligandos coestimulantes deseados para establecer una aAPC de tipo DC. Una aAPC de este tipo tiene las ventajas de las DC, incluyendo altos niveles de expresión de MHC, una amplia serie de ligandos coestimulantes, y la capacidad de entablar interferencia de citocinas con una célula T. Las aAPC basadas en células K562 también carecen de las desventajas de las DC, tales como su vida útil limitada, falta de capacidad replicativa y requisitos de maduración mal definidos (Lee *et al.*, 2002, Vaccine 20:A8-A22).

#### Transducción de células K562 para producir aAPC

Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran la creación de una aAPC K562 mediante introducción mediada por lentivirus de ligandos coestimulantes que permiten que las células K562 imiten mejor la potente capacidad estimulante de células T de las DC.

Se transfectaron células K562 con el receptor de Fc humano CD32 (“célula K32”) para permitir la carga con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y también se transfectó la célula con 4-1BBL humano (“células K32/4-1BBL”) para obtener coestimulación añadida (figura 1). Se produjeron aAPC KA2/32/86/4-1BBL/CD83 con un vector lentiviral CD83 mediante espinoculación (O’Doherty *et al.*, 2000, J. Virol. 74:10074-10080) para transducir la célula KA2/32/86/4-1BBL parental. Se mezclaron aproximadamente 5 millones de células KA2/32/86/4-1BBL con 500  $\mu$ l de virus concentrado ( $5 \times 10^7$  -  $5 \times 10^8$  UFI/ml) y se centrifugaron a 1200g durante 2 horas. Cinco días tras la transducción se tiñeron las células con un Ac específico para CD83 y se usó un clasificador de Moflo para aislar clones de alta expresión. 15-20 días tras la clasificación, había colonias de clones individuales visibles y se examinaron estas colonias de clones individuales mediante expresión de CD83. Se expandieron adicionalmente los clones de alta expresión y se midieron los niveles de expresión de los otros marcadores introducidos (HLA-A2, 4-1BBL, CD86 y CD32) para garantizar que los descendientes eran similares a la línea celular parental en todo menos en la expresión de CD83. De esta manera se crearon las aAPC K32/86/4-1BBL/ICOS-L y K32/86/4-1BBL/ICOS-L/CD83 usando los virus apropiados.

Usando los métodos descritos en el presente documento, se ha logrado la expresión estable de al menos nueve (9) genes en una aAPC K562. Se transdujeron los siguientes genes en una célula K562 y se expresaron de manera estable, según se detecta usando citometría de flujo: Flu-GFP (figura 8A); CD80 (figura 8B); CD86 (figura 8C); 4-1BBL (figura 8D); y HLA ABC (figura 8E). La célula KT32/A2/4-1BBL/40L/CD80/CD83/CD86 también expresó de manera estable niveles detectables de CD32, CD83, CD40L e ICOS-L. Estos niveles de expresión permanecieron constantes durante más de 3 meses de cultivo continuo sin ninguna selección. Además, en la figura 3 se ilustra la producción de varias aAPC. Estas aAPC comprenden la expresión de todos los transgenes impulsados por el promotor de CMV. Aunque pueden producirse reducciones de niveles de expresión de transgenes debido al secuestro de factores de transcripción específicos de CMV, (Cahill *et al.*, 1994, FEBS Lett. 344:105-108; Kang *et al.*, 1992, Science 256:1452-1456) hasta la fecha no se ha detectado ninguna evidencia de ningún problema con la transducción en serie de células K562 con cinco vectores lentivirales diferentes (figura 3).

Usando los métodos descritos anteriormente para transducir una célula K562, se comparó una célula K562cc parental con células K562 transducidas con LV (por ejemplo, transducidas con y que expresaban cinco y ocho genes). Tal como se ilustra en las figuras 7 y 8, las células transducidas con LV muestran cinética de crecimiento favorable en comparación con células parentales por lo demás idénticas pero no transducidas.

Además de la expresión de ligandos coestimulantes, las aAPC divulgadas pueden usarse para producir diversas citocinas, tal como se muestra a modo de ejemplo mediante la producción de IL-7 e IL-15 mediante células K562 transducidas con vectores CD32/IRES/IL-7 y CD32/IRES/IL-15. Se clasificaron las células para detectar la alta expresión de CD32 y se evaluó la producción de la interleucina respectiva (figura 13), demostrando que se producía la citocina apropiada.

Además, usando los métodos para transducir una célula K562 descritos anteriormente, las aAPC expresan CD32 a partir de un LV a un nivel mayor que la expresión de CD32 en una célula K562 por lo demás idéntica transfectada usando un vector de plásmido (figura 11). Estos datos demuestran que, sorprendentemente, las células K562 se transdujeron fácilmente usando vectores lentivirales. La figura 11D es un gráfico que representa que la expresión de CD32 usando un LV para transducir células K562 es mayor que el nivel de expresión de CD32 en una célula K562 por lo demás idéntica transfectada usando un vector de plásmido. Además, los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que el nivel de expresión de CD32 se mantuvo durante más de nueve meses. Además, este nivel de expresión de CD32 se mantuvo durante más de nueve meses. A continuación se describe la caracterización de células aAPC que expresan CD64.

Además, los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que las aAPC crecen en cultivo en medio libre de suero de ternero fetal (FCS), una consideración importante para la producción de aAPC para su uso en el tratamiento de pacientes humanos (véase la figura 7). Estos datos demuestran que las aAPC novedosas de la invención crecen en medio definido (Aim V) que comprende suero AB al 3%. Es decir, se produjeron diversas aAPC basadas en células K562 mediante transducción de células K562 parentales (k562cc) usando vectores de lentivirus (“LV”): KT32 (1 gen); KT32/4-1BBL/CD86 (3 genes); KT32/4-1BBL/CD86/A2/Flu-GFP (5 genes). Además, tal como se ilustra en la figura 7, la introducción de un vector lentiviral no altera significativamente las tasas de crecimiento de las células K562. Estos datos demuestran que pueden producirse bancos de células maestros usando aAPC K562 transducidas con LV y que las aAPC crecen igual de bien que las células parentales.

Los presentes datos han demostrado los métodos para transducir células K562 y las propiedades de expresión y crecimiento de estas aAPC. Además, se ha evaluado la estabilidad a largo plazo y la expresión suficiente de una citocina/molécula coestimulante transducida en una aAPC basada en células K562. Se ha expresado de manera estable CD32 en una célula K562 transducida durante más de nueve meses. Además, también se ha logrado la expresión detectable y estable de al menos ocho moléculas exógenas introducidas en una aAPC basada en células K562 (KT32-A2-41BBL-40L-80-83-86), y no hay ningún dato que sugiera que moléculas adicionales no se expresarán de manera similar. De hecho, se ha producido una aAPC que expresaba nueve genes (incluyendo ICOS-L) durante más de 60 días en este momento. Por tanto, en la actualidad, la capacidad de las aAPC para expresar una variedad de moléculas en una única single aAPC no está limitada. Además, las aAPC de la invención son negativas para micoplasma y lentivirus competente para la replicación (LCR), y puede evaluarse fácilmente su

seguridad y falta de cualquier patógeno contaminante.

La presente solicitud comprende numerosas aAPC basadas en células K562 producidas, según los métodos expuestos en el presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a, las expuestas en la tabla 2. Estas aAPC, que comprenden combinaciones de diversas moléculas inmunoestimulantes, pueden usarse para métodos tanto *ex vivo* como *in vivo* que comprenden la expansión de determinados subconjuntos de células T, identificación de combinaciones de factores que expanden subconjuntos de célula T, así como terapia génica y basada en células en la que se administran las aAPC, y/o células T expandidas mediante las mismas, a un paciente que lo necesita. Evidentemente, la lista expuesta en la tabla 2 es simplemente ilustrativa de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

TABLA 2

aAPC de expansión de células T policlonales (denominadas serie "KT32")	aAPC de expansión de células T específicas de antígeno (denominadas serie "KTA2")
KT32	KTA2
KT32/4-1BBL	KTA2/86
KT86	ktA2-86-ICOSL
KT83	ktA2-41BBL
KT80	ktA2-41BBL-FLU-GFP
KT86-80	ktA2-41BBL-86-FLU-GFP
KT83-80	ktA2-32-41BBL-FLU-GFP
KT32/86/83	ktA2-86-FLU-GFP-CD40L
kt32-ICOSL	ktA2-41BBL-86-FLU-GFP-83
kt86-ICOSL	ktA2-41BBL-86-FLU-GFP-CD40L
kt32-41BBL-80	ktA2-86-FLU-GFP-CD40L
kt32-41BBL-86 (hi, lo)	*ktA2-41BBL-86-83-40L-80-Flu-GFP
kt32-41BBL-83	
kt32-IL7	
kt32-IL15	
ktIL-21	
kt32-41BBL-86-83	
kt32-41BBL-86-83-IL15	
kt32-CD30L	
kt32-OX40L	
kt32-HLA-DR (clase II del MHC)	

Ejemplo 2: Uso terapéutico *in vivo* de aAPC

La solicitud incluye aAPC K562 modificada por ingeniería de LV para la vacunación terapéutica *in vivo* y para la expansión *ex vivo* de células T para usos terapéuticos. Los antígenos, las citocinas y/o las moléculas coestimulantes pueden transducirse en una célula K562 bajo el control de promotores/secuencias reguladoras iguales o independientes. Además, puede transducirse un ácido nucleico que codifica para el antígeno de célula tumoral en la célula o puede cargarse de otro modo el antígeno en la célula de manera que la célula procesa y presenta el epítipo apropiado en el contexto de una proteína de MHC. Esto se debe a que se ha demostrado en otra parte en el presente documento que las células K562 tienen la capacidad de procesar y presentar antígenos sin la necesidad de identificar o aislar en primer lugar el antígeno o epítipo específico requerido. Por tanto, puede cargarse un extracto celular (que comprende al menos un componente de membrana de una célula tumoral) en la aAPC basada en células K562 y se aprovecha la capacidad natural de la célula para procesar y presentar el antígeno relevante. Aunque en el presente documento se exponen aAPC personalizadas, estas son únicamente con fines ilustrativos, y la invención no se limita a estas realizaciones expuestas en la tabla 3. Esto se debe a que, tal como apreciará el experto dotado de las enseñanzas proporcionadas en otra parte en el presente documento, puede transducirse y expresarse una multitud de moléculas por las aAPC en una combinación prácticamente ilimitada.

TABLA 3

Indicación	Epitelial (mama / colon / pulmón / ovarios / próstata)	Neoplasia hemática (LMC / LMA / linfoma / LLA)	Piel (melanoma / Merkel)	Autoinmunitaria / trasplante (SR / LES / EICH / trasp. de órgano)
aAPC	KT-BCLOP	KT-CALA	KT-MM	KT-T <sub>REG</sub>
coestim.	CD80/83/41BBL/OX40L	CD80/83/41BBL/OX40L	CD80/83/41BBL/OX40L	CD86 dim/B7H-3/MHCII
antígenos	gp100/MAGE	Por determinar		Por seleccionar
citocinas	GM-CSF/IL-15/ SLC	GM-CSF/IL-15/ SLC	GM-CSF/IL-15/SLC	TGFbeta/IL-10

Ejemplo 3: Usos terapéuticos *ex vivo* de aAPC

Pueden prepararse otras aAPC para su uso *ex vivo*, tal como, pero sin limitarse a, inmunoterapia adoptiva y terapia génica. Entre las versiones personalizadas de aAPC para tales usos *ex vivo* se encuentran, entre otros, los constructos dados a conocer en la tabla 4 a continuación. Es decir, células T aisladas de un sujeto pueden estimularse y expandirse *in vitro* usando estas, o una amplia cantidad de otras, aAPC y después pueden introducirse las células T en el sujeto proporcionando así inmunoterapia adoptiva al mismo. Adicionalmente, las células T expandidas pueden modificarse por ingeniería genética para expresar una proteína exógena que no se expresaba, o se expresaba a un nivel inferior, en comparación con la expresión de la proteína en la célula T antes, o en ausencia, de la modificación por ingeniería genética. Por tanto, la presente solicitud proporciona tanto inmunoterapia adoptiva como terapia génica basadas en células *ex vivo* usando las aAPC divulgadas para expandir células T usadas para el trasplante autólogo de un sujeto que lo necesita. La tabla 4 simplemente expone varios ejemplos ilustrativos de aAPC que pueden usarse para tal terapia de células/génica, pero la invención tal como se define en las reivindicaciones no se limita a esas aAPC disponibles comercialmente a modo de ejemplo.

TABLA 4

Indicación	CTL (melanoma, VIH, CCR)	Células T modificadas por ingeniería genética (VIH / cáncer)
AAPC	KT-A2	KT32
Coestim.	CD80/83/83/4-1BBL	Anticuerpo anti-CD3, 28/4-1BBL/83
Antígenos	De elección	Ninguno
citocinas	IL-7/IL-15/SLC	IL-7, IL-15

#### 15 Ejemplo 4: Estimulación de células T CD 4 humanas con aAPC

Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que se obtuvo el crecimiento a largo plazo de células T CD4 usando aAPC K32/CD3/28 y K32/86CD3 en ausencia de citocinas exógenas, pero las aAPC basadas en células U937 no fueron eficaces (figura 5). Además, los datos demuestran que las aAPC basadas en células K562 (por ejemplo, K32/CD3/28, K32/86/CD3) median en el crecimiento a largo plazo de células T CD4 de manera más eficaz que aAPC basadas en perlas (perlas recubiertas con CD3/28) en las que tanto las perlas como las células estaban cargadas con CD3 y CD28. Estos resultados demuestran que se produce "interferencia" detectable entre las aAPC basadas en células K562 y células T, lo cual no es posible usando sistemas basados en perlas. Tal como se ilustra en la figura 5, no todas las líneas de células tumorales tienen la capacidad de servir como APC artificiales y los datos demuestran adicionalmente la capacidad de células K562 para servir como potentes APC, lo cual no se esperaba. Estos resultados sorprendentes respaldan la mejora significativa con respecto a métodos de la técnica anterior que es posible usando aAPC basadas en células K562.

Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran adicionalmente la utilidad de aAPC basadas en células K562 para inducir la expresión de citocinas y/o moléculas coestimulantes mediante células T CD4 (figuras 6A-6D). Todos estos datos demuestran que las aAPC basadas en células K562 son muy superiores a las aAPC basadas en células U937 en cuanto a la inducción de la expresión génica de citocinas y componentes coestimulantes (coestim.) mediante células T y que algunos constructos de aAPC son mejores que otros, dependiendo en cierta medida de la citocina y/o molécula coestimulante que esté expresándose. Más específicamente, aunque K32/CD3/28 fue generalmente superior en comparación con las otras aAPC, expresión de B7-H3 fue en realidad mayor mediante K32/CD3 en presencia de CD4 en comparación con K32/CD3/28 en condiciones similares. Estos datos demuestran que las aAPC K562, al interactuar con células T, producen una serie de citocinas y moléculas coestimulantes adicionales (interferencia de APC y células T) que puede potenciar adicionalmente la activación y expansión de células T. Más específicamente, se sometieron a ensayo diversas aAPC basadas en células K562 y U937 transducidas con diversos vectores que codificaban para determinadas moléculas (por ejemplo, K32/CD3/28, K32/CD3, K32, U32/CD3/28, U32/CD3, U32) para determinar su capacidad para inducir la expresión de moléculas de interés (por ejemplo, IL-15, PD-L-1, PD-L2 y B7-H3). Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que las aAPC basadas en células K562 indujeron expresión detectable de estas moléculas y lo hicieron en mucha mayor medida que las células basadas en células U937. Estos datos demuestran adicionalmente la utilidad de las aAPC novedosas, y la mejora significativa con respecto a métodos de la técnica anterior ya que todos estos datos demuestran que las aAPC basadas en células K562 son muy superiores a las aAPC basadas en células U937 en la inducción de la expresión génica de citocinas y componentes coestimulantes (coestim.) mediante células T. Estos resultados son particularmente notables dadas las enseñanzas anteriores que demostraban que la línea celular parental K562 demuestra una escasa actividad estimulante de células T (Britten *et al.*, 2002, J. Immunol. Methods 259:95-110).

Dados los resultados superiores de aAPC de la presente solicitud en comparación con células K562 parentales, aAPC basadas en células U-937 y perlas, se evaluaron las capacidades relativas de las diversas aAPC dadas a conocer en el presente documento. Algunos constructos de aAPC son mejores que otros en la mediación en un efecto sobre determinadas células T, y la eficacia varía en cierta medida dependiendo de la citocina y/o molécula coestimulante, o combinaciones de las mismas, que estén expresándose. Más específicamente, aunque K32/CD3/28 fue generalmente superior en comparación con las otras aAPC, la expresión de B7-H3 fue en realidad mayor mediante K32/CD3 en presencia de CD4 en comparación con K32/CD3/28 en condiciones similares. Estos

datos demuestran adicionalmente que determinadas combinaciones de moléculas expresadas en las aAPC basadas en células K562 novedosas tienen un mayor efecto sobre determinadas poblaciones de células T. Por tanto, estos datos proporcionan un sistema novedoso para evaluar la eficacia de diversas combinaciones de moléculas para lograr efecto(s) deseado(s) y/o para estimular y expandir subconjuntos de células T de interés, nada de lo cual era posible antes de la presente invención.

#### Ejemplo 5: Estimulación de células T CD8 humanas con aAPC

En resumen, se recubrieron 50.000 células KT32/4-1BBL/CD86 irradiadas con Ac anti-CD3 y se mezclaron con 100.000 células T CD8 recién aisladas de un donante sano. Cada 10-12 días volvieron a estimularse las células T CD8 con aAPC KT32/4-1BBL/CD86 recién irradiadas. El número total de células que se habrían acumulado si no se hubieran desechado células se representa como gráfico semilogarítmico del número de célula total frente a días en cultivo (figura 9). Tal como se ilustra en la figura 9, las células T CD8 policlonal expandidas mediante aAPC transducidas con CD32 y 4-1BBL (K32/4-1BBL) se expandieron 18.600 veces tras 43 días.

Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran adicionalmente la expansión de células T<sub>CM</sub> CD8 específicas de antígeno usando una aAPC (por ejemplo, aAPC K32/K-41BBL). En resumen, se expandieron células T tanto positivas para tetrámero de la gripe como negativas para tetrámero de la gripe (figuras 10A-10C) en función de los días en cultivo en el que se añadió interleucina 2 (IL-2) al medio de cultivo en el día 20. Los datos demuestran un desplazamiento en el día 16 de las células teñidas para determinar la expresión de CD8 usando citometría de flujo en el que se clasificaron las células como negativas para tetrámero de la gripe o positivas para tetrámero de la gripe, demostrando una proliferación específica de antígeno de células T<sub>CM</sub> CD8 cultivadas con aAPC K32/4-1BBL. En el día 26, se sometieron a ensayo las células para determinar su capacidad para someter a lisis específicamente células positivas para tetrámero de la gripe o negativas para tetrámero de la gripe que eran T2 nulas o expresaban T2-gripe. Los datos demuestran que la destrucción celular era específica para células diana T2-gripe positivas para tetrámero tal como se demuestra mediante un ensayo de liberación de cromo (figura 10E). La lisis específica en porcentaje fue una función de la razón de células efectoras:diana (E:T), detectándose una lisis celular específica máxima a una razón de 10:1, y disminuyendo después de eso a medida que disminuía la razón E:T hasta 1:1. A todas las razones E:T examinadas, se observó lisis celular específica para células T2-gripe positivas para tetrámero usando las células expandidas usando la aAPC.

Para determinar si las aAPC de la presente solicitud pueden actuar de una manera específica de antígeno/MHC, se transdujeron células K562 con HLA-A2, CD86, 4-1BBL, CD32, CD64 y minigén de MP1 de influenza que codifica para el epítipo restringido A2 GILGFVFTL (SEQ ID NO: 1) unido a GFP. El análisis mediante FACS de esta aAPC KA2/32/86/4-1BBL/Flu-GFP demostró que los cinco marcadores se expresan a altos niveles (figuras 3 y 12), y se observó expresión estable de todos los transgenes durante hasta nueve meses de cultivo continuo.

Para demostrar que estas aAPC eran suficientes para expandir células específicas de antígeno, se aislaron 1500 células positivas para tetrámero de la gripe a partir de un donante de HLA-A2 y se mezclaron con 3000 aAPC KA2/32/86/4-1BBL/Flu-GFP irradiadas. Cada 10 días se añadieron aAPC KA2/32/86/4-1BBL/Flu-GFP recién irradiadas al cultivo de modo que habría aproximadamente 1 aAPC por cada dos células T. Tras 22 días, había aproximadamente 10 millones de células T CD8. Se teñieron estas células con un tetrámero A2 específico de la gripe y más del 90% de las células eran específicas de la gripe (figura 12F), lo cual representa un enriquecimiento de aproximadamente 250 veces en comparación con las células antes de la clasificación (figura 12E). Estos datos demuestran que las células K562 tienen la capacidad de procesar y presentar antígeno y expandir células T específicas de antígeno sin el uso de un anticuerpo. Resulta importante que las aAPC KA2/32/86/4-1BBL/Flu-GFP no pudieron expandir células T a partir de la fracción de células negativas para tetrámero.

Se usó un protocolo experimental similar para expandir células T específicas de la gripe, pero se usó anticuerpo anti-CD3 para suministrar una señal de "uno" en lugar de un péptido unido a clase I de MHC (figura 2). En resumen, se teñieron las células con secuencia de aminoácidos de péptido de proteína de la matriz de influenza cargada con MHC tetramérico A\*0201 (GILGFVTVL; SEQ ID NO: 1), y se clasificaron en fracciones positiva y negativa. Tras 17 días de expansión usando aAPC K32/4-1BBL/CD3/28, se teñó cada población de células con el mismo tetrámero usado para la clasificación inicial. Sólo aproximadamente el 60% de las células fueron positivas para tetrámero de la gripe y el nivel global de tinción fue menor. Esto sugiere que las aAPC KA2/32/86/4-1BBL/Flu-GFP expanden selectivamente un receptor de células T (TCR) que tiene la mayor afinidad por el péptido GILGFVFTL (SEQ ID NO: 1) presentado por HLA-A2.

Para determinar si la aAPC K32/4-1BBL recubierta con Ac anti-CD3 y CD28 podía usarse para expandir células T CD8 específicas de antígeno, se cultivó una población de células T CD8<sup>+</sup> primarias clasificadas mediante tetrámero de MHC con aAPC K32/4-1BBL/CD3/28 durante 10 semanas (figura 2A). Se teñieron células T de individuos A\*0201 con inmunidad frente a influenza con AcM anti-CD8 y un tetrámero de MHC A\*0201 complejo con un epítipo de péptido restringido para A\*0201 de la proteína de la matriz de influenza (tetrámero de MP de la gripe). Se clasificó la población positiva para tetrámero de baja frecuencia (menos de aproximadamente el 0,1%) y se estimuló con aAPC K32/4-1BBL irradiadas recubiertas con Ac anti-CD3 y CD28. Volvieron a estimularse todas las células con aAPC K32/4-1BBL a intervalos de aproximadamente 10 días. No se proporcionó ninguna estimulación de gripe específica durante el cultivo. Se obtuvieron curvas de crecimiento exponenciales durante varios meses de cultivo. En un

experimento representativo, aproximadamente 8.000 células T específicas de antígeno proporcionaron 1,5 x 10<sup>9</sup> células tras un mes de cultivo (figura 2B), lo cual es un número suficiente para inmunoterapia eficaz (Riddell *et al.*, 1995, *Annu. Rev. Immunol.* 13:545-586). Un análisis fenotípico de cultivos demostró que las aAPC irradiadas mezcladas con células T humanas en reposo proporcionaron una población de células T puras en el plazo de una semana. Además, las células positivas para tetrámero de MP de la gripe presentaron una potente citotoxicidad para dianas T2 pulsadas con péptido de MP de la gripe (figura 2C). Esta estrategia puede adaptarse para expandir células T CD8 específicas de VIH y usar estas aAPC para expandir células T CD8 con una amplia especificidad.

También se usó la aAPC K32/4-1BBL para expandir linfocitos citotóxicos (CTL) específicos de hTERT. CTL específicos de hTERT expandidos usando una aAPC K32/4-1BBL sometieron a lisis específicamente células de carcinoma que expresaban HLA-A2 y positivas para telomerasa (OV-7) pero no células de carcinoma que eran positivas para telomerasa y negativas para HLA-A2 (SK-OV-3) (figura 10E). Por tanto, la aAPC indujo la expansión de CTL específicas de antígeno que requieren que se reconozca el antígeno en el contexto de HLA-A2. Además, durante la expansión, los CTL, que se obtuvieron a partir de una paciente con cáncer de mama vacunada con hTERT, demostraron un aumento detectable, tal como se evalúa usando clasificación mediante MoFlo, en el porcentaje de CTL CD8 tet+ durante la expansión mediante aAPC K32/4-1BBL. El momento de clasificación mediante MoFlo correspondiente a cada una de las figuras 10A-10C se indica en el gráfico mostrando duplicaciones de la población tal como se indica mediante una flecha (figura 10D).

Sorprendentemente, los datos dados a conocer en el presente documento demuestran, por primera vez, que las aAPC basadas en células K562 tienen la capacidad de procesar un antígeno que después se presenta a células T expandiendo así células T específicas de antígeno en las que el epítipo particular responsable de la expansión no se conoce de manera previa. Más específicamente, se obtuvieron células T purificadas a partir de un donante de HLA A\*0201 y se tiñeron las células con AcM anti-CD8 y un tetrámero de MHC A\*0201 complejo con un epítipo restringido para A\*0201 de la proteína de la matriz de influenza (tetrámero de MP de la gripe). La población positiva para tetrámero de aproximadamente 1.500 células se clasificó y estimuló usando aAPC KTA2/CD32/4-1BBL/FLU-GFP irradiadas cargadas con anticuerpo anti-CD28. Volvieron a estimularse las células con aAPC KTA2/CD32/4-1BBL/FLU-GFP aproximadamente cada 10-12 días. Se añadió interleucina 2 al cultivo en cada alimentación, aproximadamente cada 2-3 días.

Tras veintiséis días de cultivo, la mayoría de las células T eran positivas para tetrámero de MP de la gripe en comparación con la población inicial antes de la clasificación, demostrando que la aAPC procesaba y presentaba el antígeno específico de la gripe y expandía eficazmente CTL específicos de la gripe (figuras 12A-12F). Estos resultados demuestran que las aAPC de la solicitud pueden usarse para expandir y producir células T específicas de antígeno incluso cuando no se conoce el epítipo preciso del antígeno requerido para producir las células. Esto es importante para el desarrollo de terapia de transferencia en la que no se conoce el antígeno preciso que estimula una célula T. Este es el caso, entre otras cosas, para antígenos específicos de tumores, en los que se conocen muy pocos. Por tanto, la presente solicitud se refiere a proporcionar un patógeno (por ejemplo, un virus) u otra molécula frente a la que se desea una respuesta de células T específica, a una célula K562 y permitir que la célula procese y presente el antígeno generando así la respuesta específica de antígeno deseada.

En un experimento adicional, se demostró que ligandos específicos fomentan una expansión no esperada de células T CD8 específicas de antígeno. La figura 21 ilustra células T específicas de CMV aisladas mediante clasificación con tetrámero y teñidas con CFSE y mezcladas con la aAPC a una razón de 2:1. La figura 21A ilustra las células CD8 específicas de CMV, la figura 21B ilustra células CD8 específicas de CMV puestas en contacto con células K32 cargadas con anticuerpo anti-CD3. La figura 21C representa células CD8 específicas de CMV puestas en contacto con aAPC que expresan CD32, IL-15, 4-1BBL, CD80 y anticuerpo anti-CD3. Estos datos demuestran que la adición de ligandos coestimulantes (en este caso CD80, IL-15 y 4-1BBL) fomenta de manera inesperada la expansión de células T CD8 específicas de antígeno.

#### Ejemplo 6: Expansión mediante aAPC de células T CD8 específicas de VIH-1 con funciones efectoras restauradas

Intentos para aumentar la respuesta de células T específicas de VIH mediante transferencia autóloga de células T CD8 específicas de antígeno no han dado como resultado una contención a largo plazo de la infección por VIH (Tan *et al.*, 1999, *Blood* 93:1506; Koenig *et al.*, 1995, *Nature Med.* 1:330-336; Brodie *et al.*, 1999, *Nature Med.* 5:34-41; Riddell *et al.*, 1996, *Nature Med.* 2:216-223; Lieberman *et al.*, 1997, *Blood* 90:2196-2206). La incapacidad de estas células para sobrevivir *in vivo* descartó cualquier intento de medir una respuesta anti-VIH de una manera clínicamente significativa. En algunos casos la desaparición temprana de estas células se explicó fácilmente como reconocimiento inmunitario de un marcador seleccionable (Riddell *et al.*, 1996, *Nature Med.* 2:216-223). En otros casos, los motivos para la muerte de células T tras la infusión fueron menos claros. Estos ensayos iniciales usaron variaciones ligeramente diferentes de carga de células sanguíneas mononucleares periféricas (PMBC) o líneas celulares linfoblastoides (LCL) con péptidos específicos de VIH, realización de dilución limitante para aislar clones y expansión de las células T *ex vivo* durante varios meses usando altos niveles de activación con IL-2 y TCR exógenos en ausencia de coestimulación para producir hasta 1 x 10<sup>9</sup> células T específicas de VIH. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, puede que el cultivo *ex vivo* prolongado, acoplado con una dependencia de altos niveles de IL-2, condujera al inicio de apoptosis en estas células una vez introducidas por infusión de nuevo en su huésped.

Aunque las aAPC basadas en perlas (perlas recubiertas con CD3/28) son vehículos eficaces para expandir células T CD4 a partir de individuos infectados por VIH (Levine *et al.*, 1996, *Science* 272:1939-1943), hay varias posibles ventajas de usar aAPC basada en células (células K562 modificadas génicamente) para su uso en ensayos clínicos de transferencia adoptiva de VIH. En primer lugar, las aAPC basadas en células expanden células T de manera mucho más robusta que los sistemas basados en perlas (Parry *et al.*, 2003, *J. Immunol.* 171:166-174). Esto reduce el tiempo requerido para obtener cantidades terapéuticas de células T, reduciendo el coste de estas terapias y quizás mejorando la función de las células una vez que se introducen mediante infusión de vuelta en el paciente. A continuación, pueden introducirse fácilmente moléculas coestimulantes adicionales en la aAPC mediante transducción lentiviral. Resulta importante que las perlas recubiertas con CD3/28 sólo son eficaces para expandir células T CD4 (Laux *et al.*, 2000, *Clin. Immunol.* 96:187-197; Deets *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 163:102-110). Por tanto, con el fin de someter a prueba el potencial de reconstitución inmunitaria de la infusión células T expandidas *ex vivo* tanto CD4 como CD8 de vuelta en individuos infectados por VIH, deben desarrollarse nuevos sistemas de expansión y tales sistemas se dan a conocer en el presente documento.

Resulta útil crear APC que expanden de manera óptima células T CD8 a partir de individuos infectados por VIH. Anteriormente, se transfectaron células K562 con CD32 (para unirse a Ac estimulante) y 4-1BBL como aAPC mínima que induce la expansión a largo plazo de células T CD8. Además, se demostró que CD86 desencadenó células T dotadas de CD28 con la misma capacidad proliferativa que el desencadenamiento de células T dotadas de CD28 con un Ac anti-CD28 (Thomas *et al.*, 2002, *Clin. Immunol.* 105:259-272). Dado que se deseaba desarrollar sistemas de cultivo independientes de Ac, se usó CD86 en vez del anticuerpo anti-CD28 para desencadenar tanto efectos coestimulantes de CD28 en la expansión de células T como replicación de VIH. Por tanto, las siguientes cinco aAPC pueden usarse para expandir y someter funcionalmente a prueba células T CD8 de pacientes infectados por VIH: KA2/32/86, KA2/32/86/4-1BBL, KA2/32/86/4-1BBL/CD83, KA2/32/86/4-1BBL/ICOS-L y KA2/32/86/4-1BBL/CD83/ICOS-L. KA2/32/86 puede estimular células T CD8 pero no las dota de potencial de crecimiento a largo plazo (Maus *et al.*, 2002, *Nature Biotechnol.* 20:143-148). Esta aAPC sirve como control negativo (o de referencia) con el que pueden compararse otros ligandos coestimulantes. Todas las aAPC creadas expresan tanto HLA-A2 como CD32. Esto permite el uso de la misma aAPC para expandir células T CD8 policlonales haciendo que la primera señal se suministre por Ac anti-CD3 unidos a CD32 (figura 1) o células T específicas de antígeno haciendo que la primera señal se inicie mediante péptido unido en HLA-A2.

KA2/32/86/4-1BBL es la aAPC mínima para expandir células T CD8 de donantes sanos (Maus *et al.*, 2002, *Nature Biotechnol.* 20:143-148). Pueden requerirse señales coestimulantes adicionales para expandir células T específicas de VIH con funciones efectoras mejoradas. La comparación de células expandidas con esta aAPC con las células expandidas con las aAPC indicadas a continuación permite la identificación de cualquier señal de coestimulación deseable adicional.

Se usa KA2/32/86/4-1BBL/CD83 porque CD83 es un marcador de DC maduras cuyo papel en la activación de células T se ha investigado recientemente. La estimulación de células T con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-CD3 y proteína de fusión CD83Ig potenció la razón de células T CD8 frente a CD4, lo que sugiere que la ligación de CD83 activa preferiblemente células T CD8. Además, las células tumorales que expresaban CD83 se destruyeron más eficazmente por células T CD8 y sensibilizaron el sistema inmunitario para rechazar también tumores deficientes en CD83 (Scholler *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 166:3865-3872; Scholler *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 168: 2599-2602).

Se usa KA2/32/86/4-1BBL/ICOS-L porque ICOS-L se une a la molécula relacionada con CD28, proteína coestimulante inducible (ICOS), proporcionando una potente señal coestimulante a células T que potencia la producción de citocinas efectoras (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13) pero curiosamente no puede producir altos niveles de IL-2 (Hutloff *et al.*, 1999, *Nature* 397:263-266) o inducir el factor de supervivencia Bcl-xL (Parry *et al.*, 2003, *J. Immunol.* 171:166-174). Todavía no están claros los papeles precisos que desempeñan ICOS y CD28 en el sistema inmunitario, pero comparar el desenlace del bloqueo de ICOS y CD28 en varios modelos de enfermedad ha revelado pistas. El bloqueo de o bien ICOS o bien CD28 interfiere tanto con la producción como con la generación de IFN- $\gamma$  inmunidad protectora en modelos de infección por virus de coriomeningitis linfocítica (VCML) (Kopf *et al.*, 2000, *J. Exp. Med.* 192:53-61) y *Toxoplasma gondii* (Villegas *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169:937-943), lo que sugiere una relación no redundante entre la coestimulación de ICOS y CD28. Además, el examen de cuándo se administra el bloqueo coestimulante ha revelado que CD28 es crucial para la sensibilización, mientras que ICOS es más importante para mantener una respuesta de células T (Gonzalo *et al.*, 2001, *Nature Immunol.* 2:597-604; Coile *et al.*, 2000, *Immunity* 13:95-105). La estimulación de ICOS-L fomenta funciones efectoras en células T tanto CD4 como CD8 (Villegas *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169:937-943; Mittrucker *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169:5813-5817; Wallin *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 167:132-139).

KA2/32/86/4-1BBL/CD83/ICOS-L permite, entre otras cosas, el examen de si hay sinergia entre la señalización de CD83 y ICOS-L en la generación de una respuesta inmunitaria.

Estas aAPC permiten la experimentación de si pueden restaurarse las funciones efectoras a células T a partir de donantes infectados por VIH-1 mediante expansión *ex vivo* óptima. Tras completarse la creación de las aAPC, se evaluó su capacidad para expandir células T CD8 policlonales aisladas de pacientes infectados por VIH y se determinó si y cómo la expansión *ex vivo* había alterado la capacidad de células T específicas de VIH para

responder a la estimulación con antígeno. A continuación, se realizó un análisis similar usando células específicas de Pol aisladas de individuos infectados por VIH y no infectados. Estos estudios demuestran el posible uso de aAPC para ensayos clínicos y permite el estudio de cómo influye la infección por VIH en el desarrollo de células T CD8 específicas de VIH.

- 5 Los métodos descritos en este ejemplo se refieren a la purificación de células T CD8 policlonales y específicas de Pol a partir de individuos infectados por VIH y no infectados. Estas células sirven como material de fuente usado en métodos dados a conocer en el presente documento.

#### Fuente y purificación de células T infectadas por VIH-1

10 Se usan donantes de HLA-A2 debido a la alta prevalencia de este alelo en la población. Inicialmente, no se usa el fenotipo viral como criterio de selección de pacientes para donantes de HLA-A2. Se ha demostrado que las células T CD8 vírgenes expresan bajas cantidades de CD4 en su superficie celular tras la activación, haciendo que sean propensas a infección por VIH (Yang *et al.*, 1998, J. Exp. Med. 187:1139-1144; Kitchen *et al.*, 1998, J. Virol. 72:9054-9060; Flamand *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 95:3111-3116; Imlach *et al.*, 2001, J. Virol. 75:11555-11564). Sin embargo, sólo las células T CD8 vírgenes parecen tener esta plasticidad y las células T específicas de Pol usadas son por definición células T de memoria. Por tanto, sin desear limitarse a ninguna teoría particular, estas células no se infectan y no se infectarán tras la expansión *ex vivo*.

20 Además de usar donantes de HLA-2, pueden usarse PBMC. Se tiñen PBMC con Ac específico de HLA-A2 marcado con FITC, BB7.2, (BD Pharmingen). Pueden obtenerse células deseadas a partir de aféresis de donantes de HLA-A2. Se obtiene una muestra aleatoria y representativa de recuentos de CD4 T y cargas virales a partir del producto de aféresis. Se usa una muestra del producto de aféresis para realizar un gradiente de Ficoll/Hypaque, y se congelan PBMC en alícuotas de 50 millones/vial. Con el producto de aféresis restante, se eliminan monocitos mediante elutriación para crear PBL y se aíslan aproximadamente 50 millones de células T CD4 mediante selección negativa (Maus *et al.*, 2002, Nature Biotechnol. 20:143-148). El resto de los PBL se usan para producir células T CD8 purificadas (mediante selección negativa) y se usan en los métodos y experimentos descritos en el presente documento.

25 Se ha medido que se encuentra que el porcentaje de células T específicas de Pol de VIH mediante tinción con tetrámero es de aproximadamente el 0,7%±1,1 (Sun *et al.*, 2003, Journal of immunological methods 272:23-34; Kostense *et al.*, 2002, Blood 99:2505-2511; Rinaldo *et al.*, 2000, J. Virol. 74:4127-4138). Por tanto, a partir de 100 millones de células T CD8, se recuperan aproximadamente 700.000 células T CD8 específicas de Pol de VIH. Las células T infectadas por VIH de corta vida presentan varios problemas técnicos y de seguridad. Vantage SE/DiVa es un clasificador con todas las características que puede medir 12 colores más dispersión directa y lateral. Vantage SE/DiVa se ha equipado con características de seguridad mejoradas (Perfetto *et al.*, 2003, Cytometry 52A:122-130) que le permiten clasificar de manera segura materiales infecciosos en 4 poblaciones a la vez.

#### Fuente y purificación de células T específicas de Pol a partir de un huésped no infectado por VIH

35 Se vacunó a siete pacientes con cáncer de mama con HLA-A2 con el péptido Pol, ILKEPVHGV (SEQ ID NO: 3), como rama de control para una vacuna con péptido hTERT (Vonderheide, 2004, Clin. Cancer Res. 10:828-839). Se usaron células de las pacientes con cáncer de mama con HLA-A2 vacunadas para expandir células específicas de Pol a partir de un huésped negativo para VIH. Se usan PMBC congeladas de estas pacientes para purificar células T específicas de Pol. La frecuencia de estas células T específica de Pol es menor que la frecuencia esperada de donantes infectados por VIH (aproximadamente el 0,1%) de modo que se obtienen menos (pero todavía un número suficiente) de estas células para iniciar los experimentos. Pueden obtenerse pacientes con células T específicas de Pol de cualquier paciente que se ha vacunado con un péptido Pol.

40 Durante la expansión *ex vivo*, se monitorizan los cultivos para detectar la evidencia de infección por VIH usando ELISA p24, ya que la infección por VIH sesga los resultados. En el caso en el que se observa una infección, se usan pacientes que presentan infección por virus R5. Los virus R5 no pueden replicarse en células T coestimuladas con CD3/28 debido a los altos niveles de secreción de los ligandos naturales de CCR5 RANTES, MIP-1 y MIP-1β así como la regulación por disminución de los niveles en estado estacionario del transcrito de CCR5 (Riley *et al.*, 1997, J. Immunol. 158:5545-5553; Carroll *et al.*, 1997, Science 276:273-276). Por tanto, la coestimulación con CD28 permite el crecimiento a largo plazo de células T infectadas por R5 sin la adición de componentes antivirales que pueden alterar las propiedades de expansión de células T. El tropismo viral se determina usando el ensayo de células GHOST desarrollado por Littman y colaboradores.

45 Además, los experimentos dados a conocer en el presente documento no requieren células T específicas de Pol puras. Pueden usarse células T CD8 específicas de Pol de VIH-1 aisladas mediante perlas magnéticas recubiertas con tetrámero (Maus *et al.*, 2003, Clin. Immunol. 106:16-22). Este método puede proporcionar un enriquecimiento suficiente de células T específicas de Pol y puede usarse para aislar células específicas de Pol.

#### Ejemplo 7: Caracterización de células T CD8 policlonales expandidas *ex vivo*

55 Se examina la capacidad para expandir células T en masa de pacientes infectados por VIH antes de caracterizar la

capacidad de estas aAPC para expandir células T específicas de VIH. Esto permite la medición de la tasa de expansión para determinar si un subconjunto particular de células T se expande preferiblemente por una aAPC con respecto a otra. Además, se usa el análisis de tinción de tetrámeros acoplado con secreción de IFN- $\gamma$  y expresión de perforina para determinar si una aAPC particular se expande y/o confiere preferiblemente una función efectora mejorada a células T CD8 específicas de gripe, CMV, VEB o VIH.

Una comparación de estos estudios con los que expanden células T CD8 específicas de VIH en aislamiento para determinar si las células T específicas de VIH tienen necesidades de ligando coestimulador único para la expansión e inducción de funciones efectoras. Se miden los siguientes atributos:

#### Expansión de células T

Para generar niveles terapéuticos de células T CD8 específicas de VIH, se expanden células T para que sean de entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 1.000.000 veces (aproximadamente 13 - 20 duplicaciones de población) (Riddell *et al.*, 1995, Annu. Rev. Immunol. 13:545-586). Hay una relación inversa entre la cantidad de tiempo que pasan las células T CD8 específicas de VIH en un cultivo *ex vivo* y el beneficio clínico potencial que estas células proporcionan a pacientes infectados por VIH. Por tanto, se determina la aAPC que expande más rápidamente las células T CD8 de pacientes infectados por VIH y se usa en los métodos dados a conocer en el presente documento.

#### Supervivencia de células T y potencial de replicación

La idoneidad de las células T tras la expansión *ex vivo* es un elemento predictivo excelente de su capacidad para funcionar *in vivo*. También se mide la capacidad de estas aAPC para inducir el gen de supervivencia celular clave Bcl-xL. Se usa el porcentaje de células apoptóticas en un cultivo durante el proceso de expansión para determinar si cualquiera de las aAPC basadas en células confiere una ventaja de supervivencia particular a las células T expandidas. Adicionalmente, se mide la longitud de los telómeros de las células tras la expansión *ex vivo* para determinar si una aAPC particular es más eficaz para conservar el potencial de replicación de las células que expande. Al final de cada cromosoma hay un gran número de repeticiones de nucleótido TTAGGG que se denominan telómeros. Cada vez que se divide una célula pierde una parte de sus telómeros. Puesto que la mayoría de las células no expresan la enzima telomerasa, que puede restablecer copias de la repetición de ADN en los extremos de los cromosomas, se cree que una vez que una célula ha perdido una masa crítica de su longitud telomérica, pierde su capacidad para dividirse. Las longitudes de los telómeros se han usado en la técnica como un modo de calibrar cuántas veces se ha replicado una célula y, por inferencia, para evaluar su potencial de replicación futuro (Palmer *et al.*, 1997, J. Exp. Med. 185:1381-1386; Weng *et al.*, 1997, J. Immunol. 158:3215-3220). Sin embargo, los linfocitos T son una de los pocos tipos celulares que pueden inducir actividad telomerasa (Weng *et al.*, 1996, J. Exp. Med. 183:2471-2479) y por tanto las diferencias relativas entre células T expandidas que usan diferentes métodos reflejan tanto el número de acontecimientos mitóticos de las células T así como el grado que se indujo por la telomerasa. Infundir células que tienen el mayor potencial de replicación es fundamental para garantizar que las células T específicas de VIH transferidas adoptivas controlan la infección por VIH a largo plazo.

#### Producción de citocinas

Las citocinas son moléculas efectoras importantes y proporcionan una percepción de la diferenciación de las células T. Se cuantifica la capacidad de cada una de las aAPC para inducir las siguientes citocinas a partir de células T CD8 derivadas de individuos infectados por VIH: IL-2 (un factor de crecimiento de células T clave para la expansión *ex vivo* y la capacidad de una célula para inducir IL-2 se correlaciona bien con su potencial de crecimiento a largo plazo); IL-4 (un marcador para la diferenciación de TH2); y IL-10 (una citocina inmunosupresora que puede ser un sustituto para el resultado de las células T reguladoras). Para los pacientes infectados por VIH, se prefiere que las aAPC que inducen células T produzcan bajos niveles de IL-10. Otras citocinas incluyen, pero no se limitan a, TGF- $\beta$  (por el mismo motivo que IL-10); IFN- $\gamma$  (un marcador para la diferenciación de TH1 y una importante citocina efectora); y TNF $\alpha$  (una importante citocina efectora).

#### Análisis de tetrámeros y de la función efectora

El ensayo de tinción de tetrámeros/IFN- $\gamma$  intracelular y de perforina desarrollado por Immunomics (según las instrucciones del fabricante) permite tanto la detección de células T específicas de antígeno acopladas con análisis fenotípico como ensayos funcionales. Este método basado en flujo es el ensayo más riguroso de la función de las células T específicas de antígeno disponible actualmente. Este ensayo se usa para determinar cómo afecta la expansión *ex vivo* al número total y a la función de las células T específicas de VIH.

#### Expansión de células T

Para evaluar cómo estas aAPC expanden a células T infectadas por VIH-1 en masa, se irradió cada aAPC, se recubrió con anticuerpo anti-CD3 y se mezcló con células T CD8 purificadas de un paciente infectado por VIH-1 a una razón de aAPC con respecto a células T de 1:2. Para comparar la tasa inicial de expansión celular, se sometieron las células a tinción con CFSE en lugar de a captación de  $^3\text{H}$ -timidina para determinar lo bien que cada aAPC inducía la proliferación de todas las células T, porque la tinción con CFSE proporciona un criterio de

valoración mucho más cuantitativo y permite el fenotipado simultáneo de las células expandidas. Se mezclan aproximadamente 20 millones de células T CD8 purificadas de un individuo infectado por VIH con CFSE 3  $\mu$ M durante 8 minutos, se lavan exhaustivamente para retirar el CFSE no unido y se estimulan con las aAPC. Cada día tras la estimulación, se retira una alícuota de células de cada cultivo y se analiza mediante citometría de flujo. La tinción con CFSE hace que las células sean altamente fluorescentes. Tras la división celular, la fluorescencia se reduce a la mitad y por tanto cuantas más veces se divide una célula menos fluorescente será. Se cuantifica la capacidad de cada aAPC para inducir proliferación de células T midiendo el número de células que se dividen una vez, dos veces, tres veces, etc. La aAPC que induce el mayor número de divisiones celulares en un punto de tiempo particular se considera el factor de expansión más potente de las células T CD8 de los individuos infectados por VIH (Wells *et al.*, 1997, J. Clin. Invest. 100:3173-3183).

Sin embargo, la tinción con CFSE sólo puede detectar un número limitado de divisiones de células T (aproximadamente 7) y para generar cantidades terapéuticas de células T para inmunoterapia, pueden ser necesarias 13-20 duplicaciones de población. Por tanto, para determinar lo bien que promueven estas aAPC el crecimiento a largo plazo de células T, se generan curvas de crecimiento celular. Estos experimentos se configuran exactamente como los experimentos de CFSE tal como se describe en otra parte en el presente documento, pero no se usa CFSE. Cada 2-3 días de cultivo, se retiran las células T de los cultivos respectivos y se cuentan usando un contador Coulter que mide cuántas células están presentes y el volumen medio de las células. El volumen celular medio es el mejor factor de predicción de cuándo volver a estimular las células. En general, cuando las células T se estimulan apropiadamente, triplican su volumen celular. Cuando este volumen se reduce a más de aproximadamente la mitad del blastocito inicial, puede ser necesario volver a estimular las células T para mantener una expansión lineal logarítmica (Levine *et al.*, 1996, Science 272:1939-1943; Levine *et al.*, 1997, J. Immunol. 159:5921-5930). Se calcula el tiempo que tarda cada aAPC en inducir 20 duplicaciones de población. Las diferencias relativas de cada aAPC para inducir este nivel de expansión de células T es un criterio importante sobre qué aAPC particular usar para avanzar en ensayos clínicos.

Se caracterizan los fenotipos de las células expandidas por cada aAPC para determinar si un subconjunto particular se expande preferentemente. Antes de cada nueva estimulación, se realiza un análisis de fenotipo de las poblaciones de células T en expansión para definir el estado de diferenciación de las células T expandidas usando las definiciones de CD27 y CD28 propuestas por Appay *et al.* (2002, Nature Med. 8, 379-385) y las definiciones de CCR7 propuestas por Sallusto *et al.* (1999, Nature 401:708-712). Se usan tinción intracelular de perforina y granzima B para realizar una medida macroscópica para estimar el potencial citolítico.

#### Tasa de apoptosis y longitud de los telómeros

Se realiza tinción con anexina V/To-Pro (Molecular Probes, Eugene, OR) antes de cada nueva estimulación para determinar si las diferencias en la tasa de crecimiento reflejan diferencias en el número de células que experimentan apoptosis. Los detalles experimentales de este ensayo se describen en detalle en Maus *et al.* (2002, Nature Biotechnol. 20:143-148). Son deseables condiciones de cultivo que conducen a la menor cantidad de apoptosis.

Las longitudes de telómero se miden usando diversas técnicas establecidas conocidas en la técnica, pero un método preferido es usar el método FISH de flujo puesto que puede realizarse de manera relativamente rápida usando muchas menos células y es más fácil de cuantificar. En este método, se desnaturalizan aproximadamente 1 millón de células T (aunque se requieren mucho menos) usando calor y formamida al 75%, y entonces se hibridan con una sonda de ADN conjugada con FITC para la secuencia TTAGGG. Se elimina por lavado la sonda no unida y se contraíñe el ADN con LDS 751. Se analiza una mezcla de 4 poblaciones de perlas marcadas con FITC, que tiene cada una cantidades conocidas de molécula equivalentes de fluorocromo soluble (MESF), en cada experimento para permitir la creación de calibración y la determinación de la longitud de los telómeros relativa de cada cultivo a lo largo del tiempo (Baerlocher *et al.*, 2002, Cytometry 47:89-99). Se mide la longitud de los telómeros relativa antes de cada nueva estimulación y se registra si cualquiera de las aAPC expande células T que tienen telómeros significativamente más largos.

#### Citocina y expresión de Bcl-xL

Para investigar la producción de citocina y los niveles de expresión de Bcl-xL, se aísla ARN de aproximadamente 1 millón de células 24 horas tras cada estimulación y se someten a RT-PCR cuantitativa para examinar la expresión relativa de, pero sin limitarse a, IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y Bcl-xL. Los detalles experimentales de estos ensayos establecidos pueden encontrarse en Maus *et al.* (2002, Nature Biotechnol. 20:143-148), Thomas *et al.* (2002, Clin. Immunol. 105:259-272) y Parry *et al.* (2003, J. Immunol. 171:166-174). Se han observado muchas discrepancias entre los niveles de ARNm de TGF- $\alpha$  y la citocina secretada (Assoian *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6020-6024) por lo que se mide la producción de TGF- $\alpha$  mediante ELISA.

#### Análisis de tetrámeros y ELISPOT

Se compara la capacidad de las células T CD8 expandidas para reconocer antígenos de recuerdo comunes y VIH. Antes de la expansión, se tiñen las células T CD8 purificadas usando los siguientes, entre otros, tetrámeros de HLA-A2 GLCTLVAML (SEQ ID NO:4) (VEB BMLF), NLVPMVATV (SEQ ID NO:5) (CMV p65), SLYNTVATL (SEQ ID

NO:6) (VIH gag p17), ILKEPVHGV (SEQ ID NO:3) (VIH RT pol), GILGFVFTL (SEQ ID NO:1) (matriz de gripe) y LLFGYPVYV (SEQ ID NO:7) (HTLV Tax) y se determina la frecuencia de estos tetrámeros antes de la expansión *ex vivo*. A continuación, se estimulan las células T CD8 en masa a partir de un donante infectado por VIH usando la aAPC dada a conocer en el presente documento y se expanden las células usando métodos descritos en el presente documento. Antes de cada nueva estimulación, se someten las células T expandidas a tinción de tetrámeros para determinar si se ha alterado la frecuencia relativa de VEB, CMV y células T específicas de VIH por la estimulación por una aAPC particular.

Es importante determinar la frecuencia de células que secretan IFN- $\gamma$  y la frecuencia de células que expresan altos niveles de perforina tras el reconocimiento de antígenos. Puede usarse el ensayo de tinción de tetrámeros/ IFN- $\gamma$  intracelular desarrollado por Immunomics, que combina un ensayo de citocina intracelular con tinción de tetrámeros para realizar ensayos funcionales basados en flujo usando células específicas de antígeno. El ensayo puede incluir la incorporación de una tinción intracelular para la expresión de perforina. Antes de congelar las PBMC aisladas de cada paciente, se usa un ensayo de tinción de tetrámeros/IFN- $\gamma$  intracelular y perforina usando cada uno de los péptidos enumerados en otra parte en el presente documento para determinar la población inicial positiva para tetrámeros/que secreta IFN- $\gamma$ /que produce perforina. Para cada péptido con un tetrámero correspondiente, se coloca aproximadamente 1 millón de PBMC en tres tubos para los siguientes controles y condiciones experimentales: 1) control estimulado no peptídico, 2) tinción de tetrámero de control sin estimulación peptídica y 3) tubo de tetrámero más péptido. A continuación, se añade el tetrámero apropiado a cada tubo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden dos microgramos de péptido al tercer tubo y se incuba la muestra durante 1 hora a 37°C. Se añade brefeldina A a los tres tubos y se incuban los tubos durante otras 4 horas. Puesto que todos los tetrámeros se marcan con P5-Cy5.5 y APC-Cy7, pueden usarse anticuerpos anti-CD27 y CD28 marcados con PerCP y APC para determinar el estado de diferenciación de células T específicas de virus. Las células se lisan, se fijan y se permeabilizan y se realizan protocolos de marcaje con IFN- $\gamma$ -FITC usando métodos conocidos en la técnica y métodos dados a conocer en el presente documento. Estos han sido satisfactorios en medir la expresión de perforina mediante la coincubación de un anticuerpo anti-perforina marcado con PE con el anticuerpo anti-IFN- $\gamma$ , lo que permite la medición simultánea de la expresión de IFN- $\gamma$  y la expresión de perforina. Dada la discrepancia notificada entre las células T específicas de VIH que secretan IFN- $\gamma$  y las que tienen potencial de eliminación (Zhang *et al.*, 2003, Blood 101:226-235), este análisis se usa para determinar cómo la expansión *ex vivo* con las diversas aAPC basadas en células altera cualquiera de estos atributos funcionales. Las células se fijan en PFA y se analizan mediante citometría de flujo. Este análisis establece un fenotipo de nivel inicial de células que expresan IFN- $\gamma$  perforina. Para determinar si se altera el porcentaje de células positivas para tetrámeros o el fenotipo de las células que secretan IFN- $\gamma$ , o que expresan altos niveles de perforina, tras la expansión *ex vivo*, se realiza el ensayo de tinción de tetrámeros/IFN- $\gamma$  intracelular usando las células T CD8 expandidas de manera diferencial. Para hacer esto, se usan PBMC autólogas y se determina el porcentaje de células T CD8 y se retiran las células T CD8 mediante reducción de perlas magnéticas. Las células T CD8 reducidas se reconstituyen con las expandidas mediante las aAPC basadas en K562 descritas en otra parte en el presente documento y se someten al ensayo de tinción de tetrámeros/IFN- $\gamma$  intracelular tal como se describe en otra parte en el presente documento. Estos experimentos proporcionan una indicación de qué aAPC podían alterar el fenotipo funcional de células T específicas de VIH durante la expansión *ex vivo*.

Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran el fenotipo de células T CD8 aisladas de individuos infectados por VIH expandidas por las aAPC basadas en células. Aunque sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se prevé que un subconjunto de aAPC puede expandir células T específicas de VIH con funciones efectoras mejoradas. Este resultado confirmaría que estas funciones efectoras pueden restablecerse mediante expansión *ex vivo*. Mediante el proceso de eliminación, se determina qué señales son necesarias para esta transformación según los métodos descritos en el presente documento. Este hallazgo se confirma haciendo crecer células T específicas de VIH en aislamiento y proporciona un fundamento para hacer de aAPC un reactivo de GMP y para realizar el ensayo clínico de fase I para comprobar si las células efectoras T CD8 expandidas *ex vivo* mejoradas pueden ayudar a controlar la infección de VIH en pacientes. Adicionalmente, este resultado establece un sistema experimental para estudiar los mecanismos que median el/los defecto(s) de células T específicas de VIH y cómo un ligando coestimulador puede superar o invertir este defecto.

#### Ejemplo 8: Caracterización de células T específicas de Pol expandidas *ex vivo*

Los métodos dados a conocer en el presente documento proporcionan percepciones importantes sobre qué aAPC es mejor para expandir células T CD8 específicas de VIH examinando la expansión y la función de estas células dentro del entorno de expansión de células T policlonales. Sin embargo, el valor de traducción de las células T policlonales expandidas *ex vivo* de individuos infectados por VIH es bajo puesto que el número de células T CD8 totales está aumentado en la mayoría de los pacientes infectados por VIH ya que los mecanismos homeostáticos ajustan la pérdida de las células T CD4 y no parece haber anomalías macroscópicas en células T CD8 no específicas de VIH (Gandhi *et al.*, 2002, Annu. Rev. Med. 53:149-172). Por tanto, para mejorar la respuesta celular de las células T CD8 específicas de VIH mediante transferencia adoptiva autóloga, se desean sistemas que expandan sólo células T específicas de VIH y les confieran funciones efectoras que puedan eliminar la infección del VIH a largo plazo.

Es deseable expandir células T específicas de Pol aisladas con tetrámeros usando cada una de las aAPC basadas en células y determinar cuál genera células T específicas de Pol que eliminan mejor células infectadas por VIH con el mayor potencial de replicación y supervivencia. Estos estudios se realizan usando células específicas de Pol aisladas de un individuo infectado por VIH con células T específicas de Pol aisladas de pacientes con cáncer vacunados con péptido específico de Pol. Esta comparación proporciona una percepción única sobre los efectos que tiene el VIH sobre la generación de células específicas de antígeno, puesto que pueden usarse los mismos reactivos y ensayos para estudiar estas células T específicas de Pol aisladas de estos dos tipos de enfermedad. Estos estudios pueden proporcionar una percepción sobre la naturaleza del defecto de las células T específicas de VIH y conducir a nuevas hipótesis sobre cómo superar estos defectos.

#### 10 Expansión y fenotipo de células T

De promedio, se aíslan 700.000 células T específicas de Pol de un individuo infectado por VIH positivo para HLA-A2 y aproximadamente 100.000 células T específicas de Pol de un paciente con cáncer vacunado. La expansión específica de antígeno puede llevarse a cabo usando tan solo 1.500 células T (figura 3). Para obtener condiciones de cultivo equivalentes, los cultivos se inician mezclando 7.500 células T específicas de Pol y 15.000 de las aAPC descritas en otra parte en el presente documento (se ha observado que invertir la razón de células T con respecto a APC es importante cuando se expanden tan pocas células) con 0,5 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 en un total de 100 µl de medios en una placa de 96 pocillos. Para comparar la capacidad de los anticuerpos anti-CD3 y K562 procesados y del antígeno presentado para estimular estas células, también se expande un conjunto idéntico de cultivos cuyas aAPC también se han transducido con un vector de expresión de Pol-GFP. Por tanto, se dispone de 10 cultivos para cada una de las células donadoras. Se añaden aAPC irradiadas recientemente a las células T policlonales en crecimiento cada 10-12 días a una razón estimada de 1 aAPC por cada 2 células T. Una vez que la población se expande hasta un punto en el que puede calcularse una cuantificación precisa del número de células presentes usando un contador Coulter, se realiza un seguimiento de la tasa de expansión de cada población. Se compara el fenotipo CD28/CD27 de las células T específicas de Pol aisladas de los pacientes con VIH y cáncer antes y después de la expansión de células T.

#### Producción de citocina, expresión de Bcl-xL, tasa de apoptosis y evaluación de la longitud de los telómeros

Estos estudios se realizan usando métodos dados a conocer en otra parte en el presente documento, excepto que el análisis comprende usar varios millones de células presentes (aproximadamente 30 días). No obstante, estos estudios deben confirmar los resultados dados a conocer en otra parte en el presente documento usando células T policlonales.

#### Eliminación de dianas infectadas por VIH

Una ventaja de expandir células T específicas de antígeno en aislamiento es que pueden realizarse múltiples ensayos de eliminación y otros funcionales de manera muy cuantitativa. La primera prueba es el ensayo de tetrámeros/IFN- $\gamma$  intracelular y expresión de perforina. Tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento, se mezclan células T CD8 expandidas *ex vivo* con las PBMC autólogas con CD8 reducido. Puesto que la mayoría de las células T CD8 son positivas para tetrámeros, se obtienen datos cuantitativos referentes a qué aAPC producen células T que producen los mayores niveles de IFN- $\gamma$  y perforina tras el contacto con el péptido Pol. Adicionalmente, puesto que el número de células con tetrámeros no es limitativo, se realiza un análisis de fenotipo completo de estas células usando CCR7, CD27, CD28, CD62L, CD45 RO, CD45 RA y CD57 (Brenchley *et al.*, 2003, Blood 101:2711-2720), correlacionando de ese modo la(s) función/funciones efectora(s) con el fenotipo de las células T.

Se evalúa la capacidad de las células T específicas de Pol expandidas de manera diferencial para eliminar células T2 cargadas con el péptido Pol a través del ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ . En este ensayo, se cargan las células T2 con el péptido Pol ILKEPVHGV antes de la captación de  $^{51}\text{Cr}$ . Tras el lavado exhaustivo, se incuban las células T2 marcadas con células T específicas de antígeno a razones de 1:30, 1:10, 1:3 y 1:1 y 1:3 durante 4 horas. Si las células T específicas de antígeno reconocen el péptido presentado en las células T2 y tienen capacidad para eliminar estas células, entonces se libera  $^{51}\text{Cr}$  y puede detectarse. Ningún control de péptido ni control de lisis con detergente permiten la determinación de lisis específica. La menor razón de diana con respecto a efector en la que se observa un alto grado de lisis específica indica qué aAPC expande células T con la mayor capacidad de eliminación.

Se compara la capacidad de las células T específicas de Pol expandidas *ex vivo* para eliminar células T2 con la capacidad de estas células para eliminar células T CD4 que expresan Pol. Este escenario imita más estrechamente las dianas *in vivo* de las células T CD8 expandidas *ex vivo*. La capacidad de estas células para eliminar células T CD4 infectadas por VIH es la prueba definitiva del principio. Además, es probable que células que están infectadas a este nivel generen un fondo muy alto en el ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  dificultando la determinación de la eficacia de las células T CD8 expandidas. Como alternativa, se transducen células T CD4 autólogas con el vector lentiviral de expresión de Pol IRES GFP que permite el seguimiento de células que expresan Pol mediante la expresión GFP. Se observó que aproximadamente el 50% de las células T transducidas por estos vectores (véase Parry *et al.*, 2003, J. Immunol. 171:166-174, para detalles de cómo las células T se transducen con vectores lentivirales) producen

dianas suficientes para los ensayos de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ . Se marcan células T CD4 transducidas con Pol así como no transducidas con  $^{51}\text{Cr}$ . Las células T CD4 no captan  $^{51}\text{Cr}$  tan bien como las células T2, por lo que la diana se cambia a la razón efectora de 1:100, 1:30, 1:10 y 1:3 para mejorar la sensibilidad del ensayo. Las diferencias entre las células T CD8 expandidas y no expandidas en su capacidad para eliminar células T CD4 que expresan Pol proporcionan un fuerte fundamento para desarrollar adicionalmente una aAPC con respecto a otra.

Se requiere la expresión de CD28 para la expansión *ex vivo* a largo plazo de células T CD8. Recientemente se ha observado que el restablecimiento de la expresión de CD28 mediante transducción con retrovirus (Topp *et al.*, 2003, J. Exp. Med. 198:947-955) restablece la capacidad de las células negativas para CD28 para producir IL-2 y para expandirse sin presencia de células T CD4. Recientemente, se ha demostrado que IL-12 restablece la expresión de CD28 para células negativas para CD28 T (Warrington *et al.*, 2003, Blood 101:3543-3549). Para determinar si IL-12 puede potenciar la expresión de CD28 y mejorar el potencial de crecimiento a largo plazo de las células T específicas de Pol, se añaden 10 ng/ml de IL-12 a los diversos cultivos específicos de aAPC/Pol se evalúan las células para determinar lo bien que se mejora la expresión de CD28 en las células específicas de Pol y si cualquiera de las aAPC puede expandir células específicas de Pol en un cultivo a largo plazo. Otras citocinas, tales como IL-21 e IL-15, pueden funcionar conjuntamente con IL-12 para inducir expansión de células T específicas de VIH. IL-21 es una citocina multifuncional que induce proliferación de células T y B y diferenciación de linfocitos citolíticos naturales (NK) (Parrish-Novak *et al.*, 2002, J. Leukoc. Biol. 72:856-863). IL-21 se produce exclusivamente por células T CD4 activadas y realiza una acción sinérgica con IL-2 y IL-15 para promover el crecimiento de células T CD8. Asimismo, IL-15 es un factor de supervivencia de células T CD8 clave y se produce por CD y macrófagos activos (Waldmann *et al.*, 2001, Immunity 14:105-110) cuya adición también puede potenciar la expansión de células T CD8.

En el caso de que las citocinas no permitan la expansión a largo plazo de células T específicas de VIH, se transducen células T específicas de Pol con un lentivirus que expresa CD28. Tal como se explica resumidamente en Parry *et al.*, 2003, J. Immunol. 171:166-174, más del 90% de las células T pueden transducirse con un solo vector transgénico (tal como se da a conocer en el presente documento, los vectores que contienen IRES son menos eficaces). Por tanto, para someter a prueba si la transducción de CD28 restablece el crecimiento a largo plazo para células T específicas de Pol, se realiza espinoculación de células T específicas de Pol (O'Doherty *et al.*, 2000, J. Virol. 74:10074-10080) con vector lentiviral que expresa CD28 inmediatamente antes de mezclar estas células con aAPC. La activación de las células T inducida por estas aAPC facilita la integración de este vector y la expresión del transgén puede observarse 12 horas tras la transducción. Estas células se cultivan tal como se da a conocer en otra parte en el presente documento, y se recuperan células T específicas de Pol. Esto es una indicación de que se requiere coestimulación de CD28 para la expansión a largo plazo de estas células. Si se usa transducción lentiviral como etapa necesaria para expandir células T específicas de VIH, puede ralentizarse el impacto de traducción de estos resultados. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la transducción lentiviral de células T a partir de un individuo infectado por VIH puede ser una opción terapéutica viable.

#### Ejemplo 9: Expansión de células T CD8 específicas de VIH con amplia especificidad

La infusión de un solo clon de CD8 que reconocía un epítipo de Nef condujo a la selección de virus que no expresaban este epítipo (Koenig *et al.*, 1995, Nature Med. 1:330-336) lo que indica que se requieren células T con múltiples especificidades para impedir mutantes de escape de VIH. Un modo potencialmente poderoso para generar células T que reconocen múltiples epítopos de un virus específico de un paciente es tener la captación de las aAPC basadas en células y presentar antígenos de manera similar a las APC naturales. Cargando virus inactivados químicamente de un paciente en aAPC basadas en K562, que expresan MHC y mezclándolos en células T autólogas, pueden expandirse células T anti-VIH específicas de paciente. Al proporcionar esta situación óptima mediante la cual las células T específicas de VIH encuentran antígenos específicos de VIH, pueden expandirse células T que reconocen antígenos inmunodominantes como crípticos, dando resultado por tanto un potencial mayor para controlar la infección por VIH. Además, las células T de una persona sana no infectada con alelos de HLA de clase I compartidos pueden vacunarse *ex vivo* con el virus inactivado químicamente del receptor, expandirse e infundirse en el paciente infectado por VIH. Esto representa una posible opción de tratamiento poderosa para un individuo con enfermedad avanzada y con un repertorio limitado de células T.

Recientemente, Lu *et al.* (2003, Nature Med. 9:27-32), demostraron que macacos a los que se habían infundido DC cargados con una forma inactivada químicamente de VIS tenían significativamente menos niveles de ARN y ADN viral, lo que sugiere que la respuesta de células T iniciada usando este enfoque de inmunoterapia puede controlar la infección por VIS. Estos datos sugieren que las células T sensibilizadas apropiadamente pueden controlar la infección por VIS y refuerza las perspectivas de una vacuna frente al VIH basada en células en seres humanos (Bhardwaj *et al.*, 2003, Nature Med. 9:13-14). Se usa el virus inactivado para cargar aAPC basadas en K562 que expresan MHC de manera similar al estudio con VIS inactivado químicamente descrito en otra parte en el presente documento. Los complejos se usan para expandir células T específicas de VIH *ex vivo* para crear una vacuna terapéutica de células T específica de paciente. Los complejos también pueden administrarse a un paciente que usa un enfoque *in vivo*.

CD107a y 107b son proteínas asociadas lisosómicas que normalmente no se encuentran en la superficie de la célula T. Al activarse TCR, se produce rápidamente la desgranulación de las células T CD8 y CD107 y otras proteínas lisosómicas se transportan a la membrana celular para facilitar la liberación de perforina y granzima. Betts *et al.*

(2003, J. Immunol. Métodos 281:65-78), demostraron que la expresión de CD107 puede detectarse en células T específicas de antígeno CD8 ya a los 30 minutos tras la estimulación con expresión máxima 4 horas tras la estimulación. Por tanto, pueden identificarse efectores específicos de antígeno sin eliminar las células T deseadas, identificando de ese modo qué antígeno está activando las células. Se realizan estudios similares para identificar y expandir células T específicas de VIH tal como se da a conocer en el presente documento.

La figura 4 ilustra, sin querer restringirse a ninguna teoría particular, un enfoque experimental para expandir células T CD8 específicas de VIH con amplia especificidad. Se dispone de bancos de células T y aislados virales autólogos, de alto título de un ensayo clínico de transferencia adoptiva completado recientemente (Levine *et al.*, 2002, Nature Med. 8:47-53) y se usan en los métodos dados a conocer en el presente documento. Un aislado viral de paciente se inactiva usando 250  $\mu$ M de aldritol-2 (AT-2) con el fin de preservar el potencial fusogénico del virus (Lu *et al.*, 2001, J. Virol. 75:8949-8956). Se valida la capacidad de AT-2 para inactivar VIH infectando blastocitos-PHA con este virus tratado y midiendo la producción de p24 a lo largo de un periodo de dos semanas. Con el fin de permitir la fusión de VIH, la aAPC basada en células que mejor permite la expansión de células T específicas de Pol se transduce con vectores de expresión lentiviral con CD4 y CCR5 que ya están disponibles (Simmons *et al.*, 2003, Virology 305:115-123). K562 son células que expresan CXCR4 de manera natural (Gupta *et al.*, 1999, J. Leukoc. Biol. 66:135-143). Estas aAPC se pulsan con los virus inactivados (50 ng de p24/millones de aAPC basadas en células) durante 2 horas a 37°C (Lu *et al.*, 2001, J. Virol. 75:8949-8956). Se mezclan cincuenta millones de células T CD8 del paciente con aAPC cargadas de antígeno por duplicado. Con un cultivo, se evalúa la utilidad de usar movilización de CD107 como sustituto de células T específicas de antígeno a las que se han conferido funciones efectoras potenciadas. Cuatro horas tras la estimulación, se tiñen las células para CADS y CD107, se clasifican las células CD8<sup>+</sup>CD107<sup>+</sup> usando el dispositivo de clasificación BLS 3 y se expanden en aislamiento usando aAPC "infectadas". Con el otro conjunto de células, se somete a prueba la capacidad de estas aAPC para expandir selectivamente células T específicas de VIH de la población policlonal. Pueden usarse aAPC infectadas por VIH inactivadas químicamente para estimular las células T CD8 en masa del individuo infectado por VIH cada 10 días. Como control, se usan tanto las células aAPC que no se han pulsado con virus, que sólo deben expandir células que reconocen antígenos de K562, como una aAPC recubierta con  $\alpha$ CD3 que expande todas las células. Tras dos semanas de expansión, se monitorizan los cultivos y se evalúan las células para determinar si se han enriquecido las células T específicas de VIH que reconocen el propio virus del paciente mejor que una cepa de VIH de referencia. Se usa PHA para estimular y superinfectar las PBMC con células T CD8 reducidas del paciente o bien con virus del paciente de alto título (aproximadamente  $5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml) o bien de manera similar con virus Bal de alto título (para pacientes con R5) o NL4-3 (para pacientes con X4) durante 3 días. La mayoría de los pacientes que recibieron células T CD4 autólogas, expandidas *ex vivo* tenían cargas virales indetectables (Levine *et al.*, 2002, Nature Med. 8:47-53) y por tanto tras sólo 3 días, la inmensa mayoría de los virus en replicación representarán el virus que se superinfectó. Aproximadamente 400.000 PBMC obtenidas de un paciente infectado con CD8 reducidas se mezclaron con 100.000 células T CD8 expandidas de una aAPC infectada con el propio virus del paciente. Tras 24 horas, se mide el porcentaje de células T CD8 que expresan INF- $\lambda$  y perforina mediante citometría de flujo intracelular. Si se observan más células T CD8 que expresan INF- $\lambda$  y perforina cuando se mezclan con las PBMC superinfectadas con el propio virus del paciente en comparación con las superinfectadas con las cepas de referencia Bal o NL4-3, la presentación de aAPC del virus del paciente permitió probablemente la expansión de células T que reconocen selectivamente los epítomos virales del paciente. Este enfoque tiene un potencial tremendo para aumentar la amplitud de respuesta al VIH de un paciente contra su propio virus o puede provocar potencialmente respuestas contra epítomos crípticos no bien presentados durante una infección por VIH natural (Sewell *et al.*, 1999, J. Immunol. 162:7075-7079). Además, estos experimentos proporcionan una determinación de si la tinción de CD107 proporciona un modo más robusto de identificar y expandir células T específicas de VIH.

Se demostró anteriormente que se generaban CTL de alta afinidad a partir de APC que expresan niveles de antígeno inferiores (Alexander-Miller *et al.*, 1996, Proc Natl. Acad. Sci U.S.A. 93:4102-4107; Oh *et al.*, 2003, J. Immunol. 170:2523-2530). Se evalúa si las aAPC que expresan niveles inferiores de MHC de clase I son más eficaces en la generación de células T de alta avididad que tienen un mayor potencial para eliminar sus dianas. Basándose en la divulgación en el presente documento, se titula la cantidad de virus usada para cargar las células KA2, o se usa una aAPC que expresa cantidades menores de HLA-A2, para garantizar que se generan respuestas de células T de alta afinidad que son útiles para inmunoterapia de transferencia adoptiva (Alexander-Miller *et al.*, 1996, Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:4102-4107).

Si la aAPC cargada con virus inactivados químicamente no es un método eficaz para expandir células T específicas de paciente, este método de generar células T específicas de VIH se compara con métodos de cebado cruzado descritos por Larsson *et al.* (2002, AIDS 16:1319-1329). Para que este método funcione, la aAPC basada en K562 posee la capacidad de captar antígenos de células T moribundas o muertas. Las células T se transducen o bien con GFP o bien con constructo de LV de fusión matriz de virus de la gripe - GFP. Estas células se someten a radiación UVB tal como se describe en Schlienger *et al.* (2003, Clin. Cancer Res. 9:1517-1527), y se mezclan con la aAPC óptima que expresa HLA-A2. Si la aAPC procesa apropiadamente las células T infectadas por gripe muertas, las células KA2 incubadas con las células T apoptóticas que expresan la proteína de fusión matriz de virus de la gripe - GFP, pero no las incubadas con células T que expresan solo GFP, pueden expandir células específicas del virus de la gripe tal como se describe en otra parte en el presente documento. Si KA2 procesa y presenta antígenos de células muertas, las células T de un paciente pueden superinfectarse con su virus. Estas células se someten a

radiación UVB y se incuban con aAPC. Entonces se evalúa la capacidad de las aAPC cargadas con células infectadas con VIH apoptóticas para promover la expansión de células T específicas de VIH tal como se describe en otra parte en el presente documento.

Alternativamente, las células T específicas de VIH con múltiples especificidades se expanden usando un panel de tetrámeros específicos de VIH. En este enfoque, una serie de tetrámeros específicos de VIH marcados con el mismo fluorocromo se mezclan con células T de un donante infectado con VIH y las células T que se unen a estos tetrámeros ordenados se clasifican para dar una población única. Esta población de células T específicas de antígeno se expande usando la aAPC óptima, tal como se describe en otra parte en el presente documento, y se evalúa la capacidad de las células T expandidas de esta manera para reconocer y responder a virus autólogo frente a cepas de referencia tal como se describe en otra parte en el presente documento. Actualmente, hay tetrámeros definidos de HLA-A2 que reconocen epítomos conservados en gag, pol y nef y pueden crearse nuevos tetrámeros que presentan péptidos específicos de VIH. Aunque este enfoque expande un número limitado de células T específicas de antígeno, debe ser suficiente para impedir el escape viral. Además, los métodos dados a conocer en el presente documento pueden trasladarse rápidamente a ensayos clínicos de fase I.

#### Ejemplo 10: Producción y evaluación de células K562 que comprenden CD32 o CD64

Se transfectaron de manera estable células K562 con (i) el receptor CD32 de Fc $\gamma$  humano para permitir la carga exógena de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y se transdujo una población independiente de células con el receptor CD64 de Fc $\gamma$  humano, que permite la carga de alta afinidad de anticuerpos de anti-CD3, anti-CD28, y otros receptores, y (ii) ligando 4-1BB humano. 4-1BB, también conocido como CD137, es un miembro de la familia de receptores de TNF que promueve la supervivencia de células T CD8 (Hurtado *et al.*, 1997, *J. Immunol.* 158:2600-2609; Takahashi *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 162:5037-5040; Tran *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 155:1000-1009). La estimulación de 4-1BB activa preferiblemente células T CD8 *in vitro*, amplifica respuestas de CTL *in vivo* y mejora la supervivencia de CTL activadas (Shuford *et al.*, 1997, *J. Exp. Med.* 186:47-55). 4-1BB es una molécula candidata que puede promover el crecimiento *ex vivo* a largo plazo de células T CD8. La tasa de crecimiento inicial de células T CD8 estimuladas con o bien perlas CD3/28 o bien aAPC K32/4-1BBL recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y CD28 (CD3/28 K32/4-1BBL) fue equivalente. Sin embargo, tras la estimulación de nuevo, sólo las células T CD8 activadas con aAPC CD3/38 K32/4-1BBL continuaron expandiéndose. Esta capacidad para expandirse se correlaciona con la regulación con incremento del gen Bcl-xL de supervivencia celular y la citocina IL-2. En ausencia de la inducción de estos genes, un gran porcentaje de cultivos se vuelven positivos para anexina V, un signo temprano de apoptosis (Maus *et al.*, 2002, *Nature Biotechnol.* 20:143-148). Se observó "interferencia" entre las aAPC basadas en células y las células T (Thomas *et al.*, 2002, *Clin. Immunol.* 105:259-272).

La transducción de células K562 con CD64 se llevó a cabo tal como sigue: Se transdujeron células K562 con un vector lentiviral que expresa CD64 (SEQ ID NO:2) según los métodos descritos en el presente documento. Se clasificaron las células de alta expresión y se examinaron los clones individuales para determinar la expresión de CD64. Se seleccionó un clon para su caracterización adicional (figura 14).

Se evaluó la capacidad de unión de las células K562 que expresan CD64 (células K64) tal como sigue. Se cargaron un millón de células K64 con 0,5-50  $\mu$ l de anticuerpos anti-IgG2a marcados con FITC durante 1 hora a 4°C, entonces se lavaron una vez y se fijaron. Usando la concentración de anticuerpos conocida (50  $\mu$ g/ml), una razón conocida de FITC/proteína (3,5) y perlas Immuno-Brite (Beckman Coulter), se calculó que la cantidad de anticuerpo unido a las células K64 era de entre aproximadamente 2000 y 6000 anticuerpos unidos a cada célula (figura 15).

Para evaluar la capacidad de células K64 para cargar anticuerpos y estimular células T, se irradiaron células K64 y K32 a 100 Gy, y se cargaron con 1  $\mu$ g/ml de mezcla de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 por 10<sup>6</sup> células en el medio PFHMII libre de proteínas (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) y se hicieron rotar a 4°C durante 1 hora. Entonces se lavaron las células tres veces con el mismo medio libre de proteínas, se resuspendieron en el mismo medio y se añadieron a células T CD4 a una razón de 2:1. Se resuspendieron las células T en RPMI+HSAB al 10% a una concentración de 10<sup>6</sup> células por mililitro. Como control, también se cargaron células K64 y K32 usando el método convencional (10 minutos a temperatura ambiente sin lavados), y entonces se mezclaron con células T CD4.

Tal como se ilustra en la figura 16, cuando se comparan las células K64 con las células K32, las células K64 cargadas con anticuerpos anti-CD3/CD28 y lavadas tres veces para retirar los anticuerpos no unidos en exceso todavía pueden estimular eficazmente a las células T. Específicamente, tal como se representa en la figura 16, las células T CD4 en reposo tienen un volumen celular medio de ~140 fl. La desaparición de esta población de células indica que las células T CD4 se han activado. Por tanto, las células aAPC de la presente solicitud pueden usarse en aplicaciones *in vivo*, tal como se describe en otra parte en el presente documento porque pueden iniciar la estimulación y la proliferación de células T sin la presencia de anticuerpo en exceso que pudiera dar como resultado una respuesta de HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) si se usan anticuerpos monoclonales en una aplicación *in vivo* de la presente invención.

Además, tal como se demuestra en la figura 17, se requiere mucho menos anticuerpo para cargar de manera óptima las células K64, pero lavar las células K64 para impedir una reacción de HAMA cuando se administra a un mamífero tienen un efecto mínimo, en caso de tener alguno, sobre la capacidad de una aAPC para estimular una célula T. Se

irradiaron las células K64 a 100 Gy y se cargaron con o bien 1, 1/4, 1/16, 1/64 o bien 1/256 mg/ml de mezcla de anticuerpo anti-CD3/anti-CD28 por  $10^6$  células por duplicado medio PFHM II libre de proteínas (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) y se hicieron rotar durante 1 hora a 4° C. Se lavó un conjunto de células tres veces con PFHM II y se resuspendió en el mismo medio. El otro conjunto de células no se lavó. Ambos conjuntos de células K64 se añadieron a células T CD4 y CD8 marcadas con CFSE a una razón de 2:1. Se resuspendieron las células T en RPMI+HSAB al 10%,  $10^6$ /ml, tal como se describió anteriormente. Como control, también se cargaron células K64 y K32 usando el método convencional (10 minutos a temperatura ambiente sin lavados), y entonces se mezclaron con células T CD4. Se midió la dilución de CFSE mediante citometría de flujo.

Tal como se ilustra en la figura 17, tres lavados para retirar el anticuerpo en exceso tienen poco efecto de aAPC que comprende CD64 para estimular células tanto CD4 como CD8.

#### Ejemplo 11: Expansión y caracterización funcional de Treg

Las células supresoras CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Treg) que se producen de manera natural desempeñan un papel activo en establecer y mantener la falta de respuesta inmunológica a los constituyentes propios (es decir, autotolerancia inmunológica) y el control negativo de diversas respuestas inmunitarias a antígenos no propios. Hay una escasez de marcadores fiables para definir Treg, pero las Treg CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> que se producen de manera natural son las más ampliamente usadas porque la evidencia acumulativa indica que esta población desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la autotolerancia inmunológica y el control negativo de las respuestas inmunitarias patológicas así como fisiológicas. Su presencia natural en el sistema inmunitario como población fenotípicamente diferenciada hace de ellas una buena diana para diseñar modos de tratar o prevenir enfermedades inmunológicas y para controlar respuestas inmunitarias patológicas así como fisiológicas. Sin embargo, existen pocos métodos, si hay alguno, para expandir y manipular esta población de células.

Con el fin de inducir la estimulación y la proliferación y para investigar las funciones de aAPC que se ponen en contacto con células Treg, se realizaron los experimentos siguientes.

Se marcaron linfocitos de sangre periférica con anticuerpo anti-CD4 y anti-CD25 y se aisló el 1% superior que expresa células CD25<sup>+</sup> mediante clasificación celular. Se estimularon estas células con perlas recubiertas con anticuerpo o bien anti-CD3 o bien anti-CD28 o células K32 cargadas con anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28. Se midió la expansión celular cultivando las células T en presencia de 3000 U/ml de IL-2 y manteniendo la concentración de células T entre 0,8 y 2 millones de células por mililitro. Se contaron las células en un contador Coulter IIE cada de dos a tres días. Tal como se ilustra en la figura 18, la estimulación con aAPC de poblaciones de Treg dio como resultado un mayor aumento en el número de células cuando se comparó con la estimulación de perlas. Además, se producen mayores números de células Treg más rápidamente que con los medios convencionales, tales como perlas.

Para evaluar la funcionalidad de las células Treg estimuladas por aAPC, se expandieron células positivas para CD4 y CD25 y negativas para CD4 CD25 durante 17 días usando células K32 cargadas con anticuerpos anti-CD3 y CD28 y 3000 U/ml de IL-2. Se mezclaron estas células con células teñidas con CFSE en reposo del mismo donante a una razón de 1:4 (1 célula expandida por cada 4 células en reposo). Se colocó esta mezcla sobre células dendríticas alogénicas y se midió la dilución de CFSE por citometría de flujo. Tal como se ilustra en la figura 19, las células Treg expandidas con aAPC suprimen una reacción linfocitaria mixta alogénica y la expansión de células T suprimidas positivas para CD4-positivas para CD25 expandidas, mientras que no lo hicieron en la población negativa para CD25.

Se realizó un experimento similar usando aAPC que expresan CD32 (células K32) que expresan OX40L. Tal como se ilustra en la figura 20, las células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se vuelven no supresoras tras un tratamiento de este tipo con aAPC.

#### **Lista de secuencias**

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Células presentadoras de antígeno artificiales novedosas y usos de las mismas

<130> EP46434IHVSEbha

<140> no cedida todavía

<141> con el presente documento

<150> Documento EP 05 769 069.5

<151> 25-05-2005

<150> PCT/US2005/018533

ES 2 668 538 T3

<151> 25-05-2005

<150> Documento US 60/575.712

<151> 27-05-2004

<160> 22

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus influenza

10 <400> 1

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1

5

<210> 2

<211> 2230

<212> ADN

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

cttgagagaca acatgtgggtt cttgacaact ctgctccttt gggttccagt tgatgggcaa 60
gtggacacca caaaggcagt gatcactttg cagcctccat gggtcagcgt gttccaagag 120
gaaaccgtaa ccttgcatg tgaggtgctc catctgcctg ggagcagctc tacacagtgg 180
tttctcaatg gcacagccac tcagacctcg acccccagct acagaatcac ctctgccagt 240
gtcaatgaca gtggtgaata caggtgccag agaggtctct cagggcgaag tgaccccata 300
cagctggaaa tccacagagg ctggctacta ctgcaggtct ccagcagagt cttcacggaa 360
ggagaacctc tggccttgag gtgtcatgcg tggaggata agctggtgta caatgtgctt 420
tactatcgaa atggcaaage cttaagttt ttccactgga attctaacct caccattctg 480
aaaaccaaca taagtcacaa tggcacctac cattgctcag gcatgggaaa gcatcgctac 540
acatcagcag gaatatctgt cactgtgaaa gagctatttc cagctccagt gctgaatgca 600
tctgtgacat cccactcct ggaggggaat ctggtaacc tgagctgtga aacaaagttg 660
ctcttgacaga ggcttggttt gcagctttac ttctccttct acatgggcag caagaccctg 720
cgaggcagga acacatcctc tgaataccaa ataactaactg ctagaagaga agactctggg 780

```

ES 2 668 538 T3

ttatactggt gcgaggctgc cacagaggat ggaaatgtcc ttaagcgcag cectgagttg 840  
 gagcttcaag tgcttggcct ccagttacca actcctgtct ggtttcatgt ccttttctat 900  
 ctggcagtgg gaataatggt tttagtgaac actgttctct ggtgacaat acgtaaagaa 960  
 ctgaaaagaa agaaaaagtg ggatttagaa atctctttgg attctggtca tgagaagaag 1020  
 gtaatttcca gccttcaaga agacagacat ttagaagaag agctgaaatg tcaggaacaa 1080  
 aaagaagaac agctgcagga aggggtgcac cggaaggagc ccagggggc cacgtagcag 1140  
 cggctcagtg ggtggccatc gatctggacc gtcccctgcc cacttgctcc cctgagcac 1200  
 tgcgtacaaa catccaaaag ttcaacaaca ccagaactgt gtgtctcatg gtatgtaact 1260  
 cttaaagcaa ataaatgaac tgacttcaac tgggatacat ttggaaatgt ggtcatcaaa 1320  
 gatgacttga aatgaggcct actctaaaga attcttgaaa aacttacaag tcaagcctag 1380  
 cctgataatc ctattacata gtttgaaaa tagtatttta tttctcagaa caaggtaaaa 1440  
 aggtgagtgg gtgcatatgt acagaagatt aagacagaga aacagacaga aagagacaca 1500  
 cacacagoca ggagtgggta gatttcaggg agacaagagg gaatagtata gacaataagg 1560  
 aaggaaatag tacttacaaa tgactcctaa gggactgtga gactgagagg gctcacgcct 1620  
 ctgtgttcag gatacttagt tcatggcttt tctctttgac tttactaaaa gagaatgtct 1680  
 ccatacoggt tctaggcata caaggggta actcatgatg agaaatggat gtgttattct 1740  
 tgccctctct tttgaggctc tctcataacc cctctatttc tagagacaac aaaaatgctg 1800  
 ccagtcttag gccctgccc tgtaggaagg cagaatgtaa ctgttctggt tgtttaacga 1860  
 ttaagtccaa atctccaagt gcggcactgc aaagagacgc ttcaagtggg gagaagcggc 1920  
 gataccatag agtccagatc ttgcctccag agatttgctt taccttctg attttctggt 1980  
 tactaattag cttcaggata cgctgctctc atacttgggc tgtagtttgg agacaaaata 2040  
 ttttctgccc actgtgtaac atagctgagg taaaaactga actatgtaa tgactctact 2100  
 aaaagtttag ggaaaaaaaa caggaggagt atgacacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2160  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2220  
 aaaaaaaaaa 2230

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 3

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val

1

5

<210> 4

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Virus de Epstein Barr  
 <400> 4  
 Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu  
 5 1 5  
 <210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Citomegalovirus humano  
 10 <400> 5  
 Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val  
 1 5  
 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana  
 <400> 6  
 Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu  
 1 5  
 <210> 7  
 <211> 9  
 20 <212> PRT  
 <213> Virus linfotrófico de células T humanas  
 <400> 7  
 Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val  
 1 5  
 <210> 8  
 25 <211> 1019  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 8

ES 2 668 538 T3

tgatgggaat cctgtcattc ttacctgtcc ttgccactga gagtgactgg gctgactgca 60  
 agtcccccca gccttgggggt catatgcttc tgtggacagc tgtgctattc ctggctcctg 120  
 ttgctgggac acctgcagct cccccaaagg ctgtgctgaa actcgagccc cagtggatca 180  
 acgtgctcca agaggactct gtgactctga catgccgggg gactcacagc cctgagagcg 240  
 actccattca gtggttccac aatgggaatc tcattcccac ccacacgcag cccagctaca 300  
 ggttcaaggc caacaacaat gacagcgggg agtacacgtg ccagactggc cagaccagcc 360  
 tcagcgaccb tgtgcatctg actgtgcttt ctgagtggtt ggtgctccag acccctcacc 420  
 tggagttcca ggaggagaa accatcgtgc tgaggtgcca cagctggaag gacaagcctc 480  
 tggccaaggt cacattcttc cagaatggaa aatccaagaa attttccogt toggatcca 540  
 acttctocat cccacaagca aaccacagtc acagtgggta ttaccactgc acaggaaaca 600  
 taggctacac gctgtaactca tccaagcctg tgaccatcac tgtccaagct cccagctctt 660  
 caccgatggg gatcattgtg gctgtggtca ctgggattgc tgtagcggcc attggtgctg 720  
 ctgtagtggc cttgatctac tgcaggaaaa agcggatttc agccaattcc actgatcctg 780  
 tgaaggctgc ccaatttgag atgctttcct gcagccacct ggacgtcaaa tgattgcat 840  
 cagaaagaga caacctgaag aaaccaacaa tgactatgaa acagctgacg gcggctacat 900  
 gactctgaac cccagggcac ctactgacga tgataaaaac atctacctga ctcttctctc 960  
 caacgaccat gtcaacagta ataactaaag agtaacgtta tgccatgtgg tcatctaga 1019

<210> 9

<211> 1589

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 668 538 T3

gaattcctct ggtcctcctc caggtgcgcg ggaagcaggt gccagagaga gaggggataa 60  
 tgaagattcc atgctgatga tcccaaagat tgaacctgca gaccaagcgc aaagtagaaa 120  
 ctgaaagtac actgctggcg gatcctacgg aagttatgga aaaggcaaag cgcagagcca 180  
 cgccgtagtg tgtgccgccc cccttgggat ggatgaaact gcagtcgagg cgtgggtaag 240  
 aggaaccagc tgcagagatc accctgcccc acacagactc ggcaactccg cggaagacca 300  
 gggtcctggg agtgactatg ggcggtgaga gottgctcct gctccagttg cggtoatcat 360  
 gactacgccc gcctcccgca gaccatgttc catgtttctt ttaggtatat ctttggactt 420  
 cctcccctga tccttgttct gttgccagta gcatcatctg attgtgatat tgaaggtaaa 480  
 gatggcaaac aatatgagag tgttctaata gtcagcatcg atcaattatt ggacagcatg 540  
 aaagaaattg gtagcaattg cctgaataat gaatttaact tttttaaag acatatctgt 600  
 gatgctaata aggaaggtat gtttttatc cgtgctgctc gcaagttgag gcaatttctt 660  
 aaaatgaata gcactggtga ttttgatctc cacttattaa aagtttcaga aggcacaaca 720  
 atactgttga actgcactgg ccaggttaaa ggaagaaaac cagctgccct ggggtgaagcc 780  
 caaccaacaa agagtttggg agaaaataaa tctttaaagg aacagaaaaa actgaatgac 840  
 ttgtgtttcc taaagagact attacaagag ataaaaactt gttggaataa aattttgatg 900  
 ggcaactaaag aacactgaaa aatatggagt ggcaatatag aaacacgaac tttagctgca 960  
 tcctccaaga atctatctgc ttatgcagtt tttcagagtg gaatgcttcc tagaagttac 1020  
 tgaatgcacc atggtcaaaa cggattaggg catttgagaa atgcatattg tattactaga 1080  
 agatgaatac aaacaatgga aactgaatgc tccagtcaac aaactatttc ttatatatgt 1140  
 gaacatttat caatcagtat aattctgtac tgatttttgt aagacaatcc atgtaaggta 1200  
 tcagttgcaa taatacttct caaacctggt taaatatttc aagacattaa atctatgaag 1260  
 tatataatgg tttcaaagat tcaaaattga cattgcttta ctgtcaaaat aattttatgg 1320  
 ctcaactatga atctattata ctgtattaag agtgaaaatt gtcttcttct gtgctggaga 1380  
 tgttttagag ttaacaatga tataatggata atgccggtga gaataagaga gtoataaacc 1440  
 ttaagtaagc aacagcataa caaggtccaa gatacctaaa agagatttca agagatttaa 1500  
 ttaatcatga atgtgtaaca cagtgccttc aataaatggt atagcaaatg ttttgacatg 1560  
 aaaaaaggac aatttcaaaa aaataaaat 1589

<210> 10

<211> 1969

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

# ES 2 668 538 T3

```

gactccgggt ggcaggcgcc cgggggaatc ccagctgact cgctcaactgc cttcgaagtc      60
cggcgcccc cgaggaggaa ctgggtggcc gcaccctccc ggctgcggtg gctgtcgccc      120
cccaccctgc agccaggact cgatggaggt acagagctcg gcttctttgc cttgggaggg      180
gagtggtggt ggttgaaagg gcgatggaat tttccccgaa agcctaagcc cagggcccct      240
cccagctcca gcgttacct ccggtctatc ctactggccg agctgccccg ccttctcatg      300
gggaaaactt agccgcaact tcaatTTTTg gTTTTcctt taatgacact totgaggctc      360
tctagccat cctcccgctt ccggaggagc gcagatcgca ggtccctttg cccctggcgt      420
gcgactccct actgcgctgc gctcttacgg cgttccaggc tgctggctag ogcaaggcgg      480
gccgggcacc ccgcgctccg ctgggagggg gagggacgcg cgtctggcgg ccccagccaa      540
gctgcggggt tctgagaaga cgtgtccccg cagccctgag ggtgagttc tgcaccagt      600
caagctcagg aaggccaaga aaagaatoca ttccaatata tggccatgtg gctctttgga      660
gcaatgttcc atcatgttcc atgctgctga cgtcacatgg agcacagaaa tcaatgttag      720
cagatagcca gccatacaa gatcgtattg tattgtagga ggcacgtgg atggatggct      780
gctggaaacc ccttgccata gccagctctt cttcaatact taaggattta ccgtggcttt      840
gagtaatgag aatttcgaaa ccacatttga gaagtatttc catccagtgc tacttgtggt      900
tacttctaaa cagtcatttt ctaactgaag ctggcattca tgtcttcatt ttgggctggt      960
tcagtgcagg gcttcctaaa acagaagcca actgggtgaa tgtaataagt gatttgaaaa     1020

```

ES 2 668 538 T3

aaattgaaga tcttattcaa tctatgcata ttgatgctac tttatatacg gaaagtgatg 1080  
 ttcaccccag ttgcaaagta acagcaatga agtgctttct cttggagtta caagttattt 1140  
 cacttgagtc cggagatgca agtattcatg atacagtaga aaatctgatc atcctagcaa 1200  
 acaacagttt gtcttetaat ggaatgtaa cagaatctgg atgcaaagaa tgtgaggaac 1260  
 tggaggaaaa aaatattaaa gaatTTTTgc agagtTTTgt acatattgtc caaatgttca 1320  
 tcaaaccttc ttgattgcaa ttgattcttt ttaaagtgtt tctgttatta acaaacatca 1380  
 ctctgctgct tagacataac aaaacactcg gcatttcaaa tgtgctgtca aaacaagttt 1440  
 ttctgtcaag aagatgatca gaccttggat cagatgaact cttagaaatg aaggcagaaa 1500  
 aatgtcattg agtaatatag tgaactatgaa cttctctcag acttacttta ctcatTTTT 1560  
 taatttatta ttgaaattgt acatatttgt ggaataatgt aaaatgttga ataaaaatat 1620  
 gtacaagtgt tgtTTTTtaa gttgcaactga tattttacct cttattgcaa aatagcattt 1680  
 gtttaagggt gatagtcaaa ttatgtattg gtggggctgg gtaccaatgc tgcagggtcaa 1740  
 cagctatgct ggtaggctcc tgccagtgtg gaaccactga ctactggctc tcattgactt 1800  
 cttactaag catagcaaac agaggaagaa tttgttatca gtaagaaaaa gaagaactat 1860  
 atgtgaatcc tcttctttat actgtaattt agttattgat gtataaagca actgttatga 1920  
 aataaagaaa ttgcaataac tggcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1969

<210> 11

<211> 611

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

gtgaaaacga gaccaaggtc tagctctact gttggtactt atgagatoca gtcctggcaa 60  
 catggagagg attgtcatct gtctgatggc catcttcttg gggacactgg tccacaaatc 120  
 aagctcccaa ggtcaagatc gccacatgat tagaatgctg caacttatag atattgttga 180  
 tcagctgaaa aattatgtga atgacttggc ccctgaattt ctgccagctc cagaagatgt 240  
 agagacaaac tgtgagtggc cagctTTTTc ctgctttcag aaggccaac taaagtcagc 300  
 aaatacagga aacaatgaaa ggataatcaa tgtatcaatt aaaaagctga agaggaaacc 360  
 acottccaca aatgcagga gaagacagaa acacagacta acatgccctt catgtgattc 420  
 ttatgagaaa aaaccacca aagaattcct agaagattc aaatoacttc tccaaaagat 480  
 gattcatcag catctgtcct ctagaacaca oggaagtga gattcctgag gatctaactt 540  
 gcagttggac actatgttac atactcta atagtagtga aagtcatttc tttgtattcc 600  
 aagtggagga g 611

ES 2 668 538 T3

<210> 12

<211> 1048

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 12

```

ggccctggga ctttgccta tttctgatt gataggcttt gttttgtott tacctccttc   60
tttctgggga aaacttcagt tttatcgac gttccccttt tccatatctt catcttccct  120
ctaccagat tgtgaagatg gaaaggtcc aaccctgga agagaatgtg ggaaatgcag  180
ccaggccaag attcgagagg aacaagctat tgctggtggc ctctgtaatt cagggactgg  240
ggctgctcct gtgcttcacc tacatctgcc tgcacttctc tgctcttcag gtatcacatc  300
ggtatcctcg aattcaaagt atcaaagtac aatttaccga atataagaag gagaaaggtt  360
tcatcctcac ttccaaaag gaggatgaaa tcatgaaggt gcagaacaac tcagtcatca  420
tcaactgtga tgggttttat ctcatctccc tgaagggcta cttctcccag gaagtcaaca  480
ttagccttca ttaccagaag gatgaggagc ccctcttcca actgaagaag gtcagggtctg  540
tcaactcctt gatggtggcc tctctgaact acaaagaca agtctacttg aatgtgacca  600
ctgacaatac ctccctggat gacttccatg tgaatggcgg agaactgatt cttatccatc  660
aaaatcctgg tgaattctgt gtcctttgag gggctgatgg caatatctaa aaccaggcac  720
cagcatgaac accaagctgg gggtgacag ggcattgatt cttcattgca agtgaaggag  780
cctcccagct cagccacgtg ggatgtgaca agaagcagat cctggccctc cggccccac  840
ccctcaggga tatttaaac ttattttata taccagtaa tcttatttat ccttatattt  900
tctaaattgc ctagccgtca caccocaaga ttgccttgag cctactaggc acctttgtga  960
gaaagaaaaa atagatgcct cttcttcaag atgcattggt tctattggtc aggcaattgt 1020
cataataaac ttatgtcatt gaaaacgg                                     1048

```

<210> 13

<211> 1645

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

ES 2 668 538 T3

agtctctcgt catggaatac gcctctgacg cttcactgga ccccgaaagcc ccgtggcctc 60  
 ccgcgccccg cgctcgcgcc tgccgcgtac tgccttgggc cctggctgcg gggctgctgc 120  
 tgctgctgct gctcgcctgcc gcctgcgccg tottctctgc ctgcccctgg gcctgttccg 180  
 gggctcgcgc ctgcgccggc tccgcggcca gcccgagact ccgcgagggc cccgagcttt 240  
 cgcccagcga tcccgcggc ctcttgacc tgcggcaggg catgtttgcg cagctggtgg 300  
 cccaaaatgt tctgctgac gatgggcccc tgagctggta cagtgaacca ggcctggcag 360  
 gcgtgtccct gacggggggc ctgagctaca aagaggacac gaaggagctg gtggtggcca 420  
 aggtggagt ctactatgtc ttctttcaac tagagctgcg gcgcgtggcg gccggcgagg 480  
 gctcaggctc cgtttcaact gcgctgcacc tgcagccact gcgctctgct gctggggccg 540  
 ccgcctggc tttgaccgtg gacctgccac ccgcctctc cgaggctcgg aactcggcct 600  
 tcggtttcca gggccgcttg ctgcacctga gtgccggcca gcgcctgggc gtocatcttc 660  
 aactgaggc cagggcagc catgcctggc agcttacca gggcgcaca gtcttgggac 720  
 tottccgggt gacccccgaa atcccagccg gactcccttc accgaggtcg gaataacgcc 780  
 cagcctgggt gcagcccacc tggacagagt ccgaatccta ctocatcctt catggagacc 840  
 cctggctgctg ggtccctgct gctttctcta cctcaagggg cttggcaggg gtccctgctg 900  
 ctgaacctcc cttgaggacc ctctcacc ccactctccc caagtggac cttgatattt 960  
 attctgagcc tgagctcaga taatatatta tataatatt atatatatat atatttctat 1020  
 ttaaagagga tcctgagttt gtgaatggac ttttttagag gaggttttt gggggggggg 1080  
 tottogacat tgccgaggct ggtcttgaac tcctggactt agacgatcct cctgcctcag 1140  
 cctccaagc aactgggatt catcctttct attaattcat tgtacttatt tgcctatttg 1200  
 tgtgtattga gcatctgtaa tgtgccagca ttgtgccag gctagggggc tatagaaaca 1260  
 tctagaaata gactgaaaga aaatctgagt tatggtaata cgtgaggaat ttaaagactc 1320  
 atcccagcc tccacctcct gtgtgatact tgggggctag cttttttctt tctttctttt 1380  
 ttttgagatg gtcttgttct gtcaaccagg ctagaatgca gcggtgcaat catgagtcaa 1440  
 tgcagcctcc agcctcgacc tcccgaggct caggtgatcc tccatctca gcctctcgag 1500  
 tagctgggac cacagttgtg tgcaccaca cttggctaac tttttaattt ttttgcgag 1560  
 acggtattgc tatgttgcca aggttgitta catgccagta caatttataa taaacactca 1620  
 ttttctca aaaaaaaaaa aaaaa 1645

<210> 14

<211> 2824

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

## ES 2 668 538 T3

aagtaacaga agttagaagg ggaaatgtcg cctctctgaa gattacccaa agaaaaagtg 60  
atitgtcatt gctttataga ctgtaagaag agaacatctc agaagtggag tcttaccctg 120  
aatcaaagg atttaaagaa aaagtggaat ttttcttcag caagctgtga aactaaatcc 180  
acaacctttg gagaccagg aacaccctcc aatctctgtg tgttttgtaa acatcactgg 240  
agggtcttct acgtgagcaa ttggattgtc atcagccctg cctgttttgc acctgggaag 300

ES 2 668 538 T3

tgccttgggc ttacttgggt ccaaattggt ggctttcact tttgacccta agcatctgaa 360  
 gccatggggc acacacggag gcaggaaca tcaccatcca agtgtccata cctcaatttc 420  
 tttcagctct tgggtgctggc tggcttttct cacttctggt cagggtttat ccacgtgacc 480  
 aaggaagtga aagaagtggc aacgctgtcc tgtggtcaca atgtttctgt tgaagagctg 540  
 gcacaaactc gcatctactg gcaaaaggag aagaaaatgg tgctgactat gatgtctggg 600  
 gacatgaata tatggcccgga gtacaagaac cggaccatct ttgatatac taataacctc 660  
 tccattgtga tcctggctct gcgccatct gacgaggga catacgagtg tgttgttctg 720  
 aagtatgaaa aagacgcttt caagcgggaa cacctggctg aagtgacgtt atcagtcaaa 780  
 gctgacttcc ctacacctag tatatctgac tttgaaatc caacttctaa tattagaagg 840  
 ataatttgct caacctctgg aggttttcca gagcctcacc tctcctgggt ggaaaatgga 900  
 gaagaattaa atgccatcaa cacaacagtt tcccaagatc ctgaaactga gctctatgct 960  
 gttagcagca aactggattt caatatgaca accaaccaca gttcatgtg tctcatcaag 1020  
 tatggacatt taagagtga tcagacctc aactggaata caaccaagca agagcatttt 1080  
 cctgataacc tgctccatc ctgggccatt acctaatct cagtaaattg aatttttgtg 1140  
 atatgctgcc tgacctactg ctttgcccca agatgcagag agagaaggag gaatgagaga 1200  
 ttgagaaggg aaagtgtacg cctgtataa cagtgtccgc agaagcaagg ggctgaaaag 1260  
 atctgaaggc ctcacctcaa tttgcaattg acctcttctg ggaacttctt cagatggaca 1320  
 agattacccc accttgccct ttacgtatct gctcttaggt gcttcttca ttcagttgct 1380  
 ttgcaggaag tgtctagagg aatatggtgg gcacagaagt agctctggtg accttgatca 1440  
 aggggttttg aatgcagaa ttcttgagtt ctggaaggga ctttagagaa taccagtgtt 1500  
 attaatgaca aaggcactga ggcccaggga ggtgaccga attataaagg ccagcgcag 1560  
 aaccagatt tcctaactct ggtgctcttt cctttatca gtttgactgt ggctgttaa 1620  
 ctggtatata catatatatg tcaggcaaag tgctgctgga agtagaattt gtccaataac 1680  
 aggtcaactt cagagactat ctgatttctt aatgtcagag tagaagattt tatgctgctg 1740  
 tttacaaaag cccaatgtaa tgcataaggaa gtatggcatg aacatcttta ggagactaat 1800  
 ggaaatatta ttgggtgtta ccagtatct ctttttttc attgtgttct ctattgctgc 1860  
 tctctcactc ccccatgagg tacagcagaa aggagaacta tccaaaacta atttcctctg 1920  
 acatgtaaga cgaatgattt aggtacgtca aagcagtagt caaggaggaa agggatagtc 1980  
 caaagactta actgggtcat attggactga taatctcttt aaatggcttt atgctagttt 2040  
 gacctcattt gtaaaatatt tatgagaaag ttctcattta aaatgagatc gttgtttaca 2100

ES 2 668 538 T3

gtgtatgtac taagcagtaa gctatcttca aatgtctaag gtagtaactt tccatagggc 2160  
ctcocttagat ccctaagatg gctttttctc cttggatatt ctgggtcttt ctgacatcag 2220  
cagagaactg gaaagacata gccaaactgct gttcatgtta ctcatgactc ctttctctaa 2280  
aactgccttc cacaattcac tagaccagaa gtggacgcaa ctttaagctgg gataatcaca 2340  
ttatcatctg aaaatctgga gttgaacagc aaaagaagac aacatctctc aaatgcacat 2400  
ctcatggcag ctaagccaca tggctgggat ttaaagcctt tagagccagc ccatggcttt 2460  
agctacctca ctatgctgct tcacaaacct tgctcctgtg taaaactata ttctcagtgt 2520  
agggcagaga ggtctaacac caacataagg tactagcagt gtttcccgta ttgacaggaa 2580  
tacttaactc aataattctt ttcttttcca tttagtaaca gttgtgatga ctatgtttct 2640  
attctaagta attcctgtat tctacagcag atactttgtc agcaatacta aggggaagaaa 2700  
caaaagttaa cgttttcttt aataaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2760  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2820  
aaaa 2824

<210> 15

<211> 2410

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

gcttccgctg cccgccgggg aatccccggg gctggcgcgc agggaagttc ccgaacgcgc 60  
gggcataaaa gggcagccgg cgcccgcgcg ccacagctct gcagctcgtg gcagcggcgc 120  
agcgtccag ccatgtcgcg cggcctccag ctctctgctc tgagctcgcg ctacagcctg 180  
gctcccgcga cgccggagggt gaagtgggct tgctccgaag atgtggactt gccctgcacc 240  
gccccctggg atccgcaggt tcctacacg gtctcctggg tcaagttatt ggaggggtgg 300  
gaagagagga tggagacacc ccaggaagac cacctcaggg gacagcacta tcatcagaag 360  
gggcaaaatg gttctttcga cgccccaat gaaaggcctt attccctgaa gatccgaaac 420  
actaccagct gcaactcggg gacatacagg tgcactctgc aggaccggga tgggcagaga 480  
aacctaagtg gcaaggtgat cttgagagtg acaggatgcc ctgcacagcg taaagaagag 540  
acttttaaga aatacagagc ggagattgtc ctgctgctgg ctctggttat tttctactta 600  
acactcatca ttttcaactg taagtttgca oggctacaga gtatcttccc agatctttct 660  
aaagctggca tggaacgagc ttttctcca gttacctccc caaataagca tttagggcta 720  
gtgactcctc acaagacaga actggatga gcaggatttc tgcaggttct tcttctgaa 780  
gtgaggctc aggggtgtgc ctgtctgtta cactggagga gagaagaatg agcctacgct 840

ES 2 668 538 T3

gaagatggca tcctgtgaag tccttcacct cactgaaaac atctggaagg ggatcccacc 900  
 ccattttctg tgggcaggcc tcgaaaacca tcacatgacc acatagcatg aggccactgc 960  
 tgctttctoca tggccacctt ttcagcgatg tatgcagcta tctggtaaac ctctgggaca 1020  
 ttttttcagt catataaaag ctatggtgag atgcagctgg aaaagggctc tgggaaatat 1080  
 gaatgcccc agctggcccc tgacagactc ctgaggacag ctgtcctctt ctgcatcttg 1140  
 gggacatctc tttgaatttc ctgtgttttg ctgtaccagc ccagatgttt tacgtctggg 1200  
 agaaattgac agatcaagct gtgagacagt gggaaatatt tagcaataat ttctgggtgt 1260  
 gaaggtcctg ctattactaa ggagtaatct gtgtacaaag aaataacaag tcgatgaact 1320  
 attccccagc agggctctttt catctgggaa agacatccat aaagaagcaa taaagaagag 1380  
 tgccacattt atttttatat ctatatgtac ttgtcaaaga aggttgtgtt tttctgcttt 1440  
 tgaaatctgt atctgtagtg agatagcatt gtgaactgac aggcagcctg gacatagaga 1500  
 gggagaagaa gtcagagagg gtgacaagat agagagctat ttaatggccg gctggaaatg 1560  
 ctgggctgac ggtgcagtct ggggtctcgc ccacttgctc cactatctgg gtgcatgac 1620  
 ttgagcaagt tccttctggg gtctgcttcc tccattgtaa accacaaggc tgttgcatgg 1680  
 gctaataag atcatatagc tgaaaattat ttgaaaacat ataaagcact atacagattc 1740  
 gaaactccat tgagtcatta tccttgctat gatgatggg ttttggggat gagagggtgc 1800  
 tatccatttc tcatgttttc cattgtttga aacaaagaag gttaccaaga agcctttcct 1860  
 gtagccttct gtaggaattc ttttggggaa gtgaggaagc caggtccacg gtctgttctt 1920  
 gaagcagtag cctaacacac tccaagatat ggacacacgg gagccgctgg cagaagggac 1980  
 ttcacgaagt gttgcatgga tgttttagcc attggtggct ttcccttacc aaacttgggc 2040  
 ccttcccttc ttggtttcca aaggcatttt attgcttgag ttatatgttc actgcccccc 2100  
 taatattagg gagtaaaacg gataccaagt tgatttagtg tttttacctc tgtcttggct 2160  
 ttcatgttat taaacgtatg catgtgaaga aaggggtgtt ttctgtttta tattcaactc 2220  
 ataagacttt gggataggaa aatgagtaa tggttactag gcttaatacc tgggtgatta 2280  
 cataatctgt acaacgaacc cccatgatgt aagtttacct atgtaacaaa cctgcactta 2340  
 taccocatgaa cttaaaatga aagttaaaaa taaaaaacat atacaaataa aaaaaaaaaa 2400  
 aaaaaaaaaa 2410

<210> 16

<211> 2794

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

ES 2 668 538 T3

aggagcotta ggaggtacgg ggagctcgca aatactcctt ttggtttatt ottaccacct 60  
 tgcttctgtg ttccttgga atgctgctgt gcttatgcat ctggtctctt tttggagcta 120  
 cagtggacag gcatttgtga cagcactatg ggactgagta acattctctt tgtgatggcc 180  
 ttctgctct ctggtgctgc tcctctgaag attcaagctt atttcaatga gactgcagac 240  
 ctgccatgcc aatttgcaaa ctctcaaac caagcctga gtgagctagt agtatcttgg 300  
 caggaccagg aaaacttggc tctgaatgag gtatacttag gcaaagagaa atttgacagt 360  
 gttcattcca agtatatggg ccgcacaagt tttgattcgg acagttggac cctgagactt 420  
 cacaatcttc agatcaagga caagggttg tatcaatgta tcatccatca caaaaagccc 480  
 acaggaatga ttcgcatcca ccagatgaat tctgaactgt cagtgccttc taacttcagt 540  
 caacctgaaa tagtaccaat ttctaataa acagaaaatg tgtacataaa tttgacctgc 600  
 tcatctatac acggttacc agaacctaa aagatgagtg ttttgctaag aaccaagaat 660  
 tcaactatcg agtatgatgg tattatgcag aaatctcaag ataatgtcac agaactgtac 720  
 gaogtttoca tcagcttgc tgtttcattc cctgatgta cgagcaatat gaccatcttc 780  
 tgtattctgg aaactgacaa gacgcgctt ttatcttcac cttctctat agagcttgag 840  
 gacctcagc ctccccaga ccacattcct tggattacag ctgtacttcc aacagttatt 900  
 atatgtgtga tggtttctg tctaattcta tggaaatgga agaagaagaa gcggcctcgc 960  
 aactcttata aatgtggaac caacacaatg gagagggag agagtgaaca gaccaagaaa 1020  
 agagaaaaaa tccatatacc tgaaagatct gatgaagccc agcgtgtttt taaaagttcg 1080  
 aagacatctt catgcgacaa aagtgatata tgtttttaat taaagagtaa agccataca 1140  
 agtatcatt ttttctacc tttccttctg aagttcctgg gcaacctttt tgatttcttc 1200  
 cagaaggcaa aaagacatta ccatgagtaa taaggggct ccaggactcc ctctaagtgg 1260  
 aatagcctcc ctgtaactcc agctctgctc cgtatgcaa gaggagactt taattctctt 1320  
 actgcttctt ttcacttcag agcacactta tgggccaagc ccagcttaat ggctcatgac 1380  
 ctggaaataa aatttaggac caatacctcc tccagatcag attcttctct taatttcata 1440  
 gattgtgttt ttttttaaat agacctctca atttctggaa aactgccttt tatctgcca 1500  
 gaattctaag ctggtgcccc actgaatctt gtgtacctgt gactaaacaa ctacctctc 1560  
 agtctgggtg ggacttatgt atttatgacc ttatagtgtt aatatcttga aacatagaga 1620  
 tctatgtact gtaatagtgt gattactatg ctctagagaa aagtctaccc ctgctaagga 1680  
 gttctcatcc ctctgtcagg gtcagtaagg aaaacgggtg cctagggtag aggcaacaat 1740  
 gagcagacca acctaaattt ggggaaatta ggagaggcag agatagaacc tggagccact 1800  
 tctatctggg ctggttctaa tattgaggag gcttgccccca cccaacaagc catagtggag 1860

ES 2 668 538 T3

agaactgaat aaacaggaaa atgccagagc ttgtgaacco tgtttctctt gaagaactga 1920  
ctagtgagat ggcctgggga agctgtgaaa gaaccaaag agatcacaat actcaaaaga 1980  
gagagagaga gaaaaagag agatcttgat ccacagaaat acatgaaatg tctgggtctgt 2040  
ccaccccatc aacaagtctt gaaacaagca acagatggat agtctgtcca aatggacata 2100  
agacagacag cagtttccct ggtggtcagg gaggggtttt ggtgatacco aagttattgg 2160  
gatgtcatct tcoctggaagc agagctgggg agggagagcc atcaccttga taatgggatg 2220  
aatggaagga ggcttaggac tttccactcc tggctgagag aggaagagct gcaacggaat 2280  
taggaagacc aagacacaga tcaccggggg cttacttagc ctacagatgt cctacgggaa 2340  
cgtgggctgg ccagcatag ggctagcaaa tttgagttgg atgattgttt ttgctcaagg 2400  
caaccagagg aaacttgcac acagagacag atatactggg agaaatgact ttgaaaacct 2460  
ggctctaagg tgggatcact aagggatggg gcagtctctg cccaaacata aagagaactc 2520  
tggggagcct gagccacaaa aatgttccct tattttatgt aaaccctcaa gggttataga 2580  
ctgccatgct agacaagctt gtccatgtaa tattcccatg tttttaccct gccctgcct 2640  
tgattagact cctagcacct ggctagtttc taacatgitt tgtgcagcac agtttttaat 2700  
aaatgcttgt tacattcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2760  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2794

<210> 17

<211> 3239

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

gcgggagcgc agttagagcc gatctccgcg gccccgaggt tgctcctctc cgaggtctcc 60  
cgcggcccaa gttctccgcg ccccgaggtc tccgcgcccc gaggtctccg cggcccaggg 120  
tctccgcccg caccatgcgg ctgggcagtc ctggactgct cttcctgctc ttcagcagcc 180  
ttcgagotga tactcaggag aaggaaagca gagcagatgg aggcagcagc gtggagctca 240  
gctgcgcttg ccctgaagga agccgttttg atttaaataga tgtttacgta tattggcaaa 300  
ccagtgagtc gaaaaccgtg gtgacctacc acatcccaca gaacagctcc ttggaaaacg 360  
tggacagcgc ctaccggaac cgagccctga tgtcaccggc cggcatgctg cggggcgact 420  
tctccctgcg cttgttcaac gtcaccccc aggacgagca gaagttoac tgectgggtg 480  
tgagccaatc cctgggattc caggaggttt tgagcgttga ggttacaactg catgtggcag 540  
caaaactcag cgtgcccgtc gtcagcgcgc cccacagccc ctcccaggat gagctcacct 600  
tcacgtgtac atccataaac ggctacccca ggcccaacgt gtactggatc aataagacgg 660

ES 2 668 538 T3

acaacagcct gctggaccag gctctgcaga atgacaccgt cttcttgaac atgcggggct 720  
 tgtatgacgt ggtcagcgtg ctgaggatcg cacggacccc cagcgtgaac attggctgct 780  
 gcatagagaa cgtgcttctg cagcagaacc tgactgtcgg cagccagaca ggaaatgaca 840  
 tcggagagag agacaagatc acagagaatc cagtcagtac cggcgagaaa aacgcggcca 900  
 cgtggagcat cctggctgtc ctgtgcctgc ttgtggctgt ggcgggtggc atagctggg 960  
 tgtgcagggg ccgatgcctc caacacagct atgcaggtgc ctgggctgtg agtccggaga 1020  
 cagagctcac tggccacggt tgaccggagc tcaccgccc gagcgtggac agggcttccg 1080  
 tgagacgcca ccgtgagagg ccaggtggca gcttgagcat ggactcccag actgcagggg 1140  
 agcacttggg gcagccccc gaaggaccac tgctggatcc cagggagaac ctgctggcgt 1200  
 tggctgtgat cctggaatga ggcccttca aaagcgtcat ccacaccaa ggcaaatgtc 1260  
 cccaagtgag tgggctcccc gctgtcactg ccagtcaccc acaggaaggg actggtgatg 1320  
 ggctgtctct acccggagcg tgcgggattc agcaccaggc tcttcccagt accccagacc 1380  
 cactgtgggt cttcccgtgg gatgcgggat cctgagaccg aaggggtgtt ggtttaaaaa 1440  
 gaagactggg cgtccgctct tccaggacgg cctctgtgct gctgggtca cgcgaggctg 1500  
 tttgcagggg acacggtcac aggagctctt ctgccctgaa cgctcccaac ctgcctcccg 1560  
 cccggaagcc acaggaccca ctcatgtgtg tgcccacaag thtagttagc cgtccacacc 1620  
 gaggagcccc cggaagtccc cactgggctt cagtgtcctc tgccacattc cctgggagga 1680  
 acaatgtccc tcggctgttc cggtgaaaag ttgagccacc tttggaagac gcacgggtgg 1740  
 agtttgccag aagaaaaggct gtgccagggc cgtgtttggc tacaggggct gccggggctc 1800  
 ttggctctgc agcgagaaag acacagccca gcagggctgg agacgccc atgtccagcagg 1860  
 cgcaggcctg gcaacacggt ccccagagtc ctgagcagca gttaggtgca tggagagggt 1920  
 atcacctggg ggccacagtc ccccttctca cctcagcaat gatccccaaa gtgagagggt 1980  
 gctcccccg cccccaccac cctcagcagc cccaccacc tcaaccctga ggtccccag 2040  
 ggtcctgatg aagacctccg accccagcgc caggctcctc ggagcccaac agtcccaagg 2100  
 gggcaggaga cggggtggtc cagtgtctgag gggtaacagc ctgggcccctg accagccccg 2160  
 gcacctgcca tgctggttcc cggaatgaat cagctgtctga ctgtctccag aagggtctgga 2220  
 aaggatgctg ccaggtgacc cgaggtgcac tcgccccagg gagatggagt agacagcctg 2280  
 gcctggccct cgggacacat tgtctgcccc ggggctatgg gcaaatgcc ctccttotta 2340  
 cttcccagaa tcccctgaca ttcccagggt cagccaggac ctggttacagc cctggctcact 2400  
 tggaaactgac agctgtgtga ggccctgact tctcagacc agacttagaa caaaaggagg 2460

ES 2 668 538 T3

agtgaggact caaggctaca atgaggttcc agtacttggt acaagaaatt ggttttctgc 2520  
 aaaaaaagtc cctacctgag cctttagggtg aatgtgggat ccaactcccgc ttttaacatg 2580  
 aaagcattag aagatgtgtg gtgtttataa aagaacagtt gtcacaccg gccattgatt 2640  
 ggcagggaca aggagctgct tgggtgtgga aagttggggc gttggaaagt gggctgtggt 2700  
 gccatttgc agtgactgtg aagtgactcc aggacggacc tgcgggggca cccagaggtc 2760  
 ctaagcccca ggactgaggg tegtgcacca ccaactcgggt gtcccgggag gtgccctggg 2820  
 cccggggacc tcacaggcag gacggcgaca ctaatgcagg gagagggagt ctggccccag 2880  
 cttttcctat cagaggcgat tttccttcac caggggatgg gcaggaaaga gccaggggcc 2940  
 ccagaagcct ctgtccctca tgcctgaggg cacgggggac acttgaggc tgctgtcacc 3000  
 actgtgcgtc caaggccatg ctctctgcgg gtcagtgcct gagtctcgc tccctgctgg 3060  
 tccctgaagc cccctcagaa gccctgcctg tcacgtoggc atttgtgaga cctacctgt 3120  
 aacgcctgcc cctctcagcc caacatcagc ttctctttc tcccttgcct tagacaggct 3180  
 ggattccagt gttgggacag ccactcaccg aaacctgact taagagagta agatgcaaa 3239

<210> 18

<211> 629

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

cgaggctgaa acgtacgttc tctctatcgt cccgtcaggc cccctcaaag ccgagatcgc 60  
 gcagagactt gaagatgtct ttgcaggaa gaacacagat ctcgaggctc tcatggaatg 120  
 gctaaagaca agaccaatcc tgtcacctct gactaagggg attttagggc ttgtgttcac 180  
 gctcaccgtg cccagtgagc gaggactgca gcgtagacgc tttgtccaaa atgccctaaa 240  
 tggaaatgga gacccaaaca acatggacag ggcagtcaaa ctttataaga agctgaaaag 300  
 agagataaca ttccatggag ctaaggagggt tgcactcagc tactcaaccg gtgcaactgc 360  
 cagttgcatg ggtctcatat acaacaggat ggggacggta accacagaag tggcttttgg 420  
 cctagtgtgt gccacttgtg agcagattgc tgattcacag catcgatctc acagacagat 480  
 ggtgactaca accaaccac taattaggca tgaaaacagg atggtgctgg ccagcactac 540  
 ggctaaggct atggagcaga tggctggatc gagtgagcag gcagcggagg ccatggagggt 600  
 tgctagtcag gctaggcaga tgggtgcagg 629

<210> 19

<211> 1267

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 668 538 T3

<400> 19

acattctctt ttctttttatt cttgtctggt ctgcctcact cccgagctct actgactccc 60  
aacagagcgc ccaagaagaa aatggccata agtggagtcc ctgtgctagg atttttcatc 120  
atagctgtgc tgatgagcgc tcaggaatca tgggctatca aagaagaaca tgtgatcacc 180  
caggccgagt tctatctgaa tcttgaccaa tcaggcgagt ttatgtttga ctttgatggt 240  
gatgagattt tccatgtgga tatggcaaag aaggagacgg tctggcggct tgaagaattt 300  
ggacgatttg ccagctttga ggctcaagggt gcattggcca acatagctgt ggacaaagcc 360  
aacctggaaa tcatgacaaa gcgctccaac tatactccga tcaccaatgt acctccagag 420  
gtaactgtgc tcacgaacag ccctgtggaa ctgagagagc ccaacgtcct catctgtttc 480  
atagacaagt tcaccccacc agtggccaat gtcacgtggc ttcgaaatgg aaaacctgtc 540  
accacaggag tgtcagagac agtcttctctg cccaggggaag accacctttt ccgcaagttc 600  
cactatctcc ccttctctgc ctcaactgag gaogtttacg actgcagggt ggagcactgg 660  
ggcttgatg agcctcttct caagcactgg gagtttgatg ctccaagccc tctcccagag 720  
actacagaga acgtggtgtg tgccctgggc ctgactgtgg gtctgggtggg catcattatt 780  
gggaccatct tcatcatcaa gggattgagc aaaagcaatg cagcagaacg cagggggcct 840  
ctgtaaggca catggagggt atggtgtttc ttagagagaa gatcactgaa gaaacttctg 900  
ctttaatggc tttaaaaagc tggcaatatt acaatccttg acctcagtga aagcagtcac 960  
cttcagcatt ttccagccct atagccaccc caagtgtgga tatgcctctt cgattgtctc 1020  
gtactctaac atctagctgg cttccctgtc tattgccttt tctgtatct attttctctc 1080  
atctctatc attttattat caccatgcaa tgcctctgga ataaaacata caggagtctg 1140  
tctctgctat ggaatgcccc atggggcacc tcttggttac ttattgttta aggtttcctc 1200  
aaactgtgat ttttctgaac acaataaact attttgatga tcttggtggg aaaaaaaaaa 1260  
aaaaaaa 1267

<210> 20

<211> 1193

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

ggggggccat agttctccct gattgagact tgcctgctgc tgtgaccact ggtcttgtcc 60  
tcttctccag catggtgtgt ctgaagctcc ctggaggctc ctgtatggca gcgctgacag 120  
tgacattgac ggtgctgagc tccccactgg ctttggctgg ggacacccaa ccacgtttct 180  
tggagcaggc taagtgtgag tgcatttcc tcaatgggac ggagcgagtg tggaaacctga 240  
tcagatacat ctataaccaa gaggagtaac gcgctacaa cagtgcacctg ggggagtacc 300

ES 2 668 538 T3

aggcggtgac ggagctgggg cggcctgacg ctgagtactg gaacagccag aaggacctcc 360  
 tggagcggag gcgggccgag gtggacacct actgcagata caactacggg gttgtggaga 420  
 gcttcacagt gcagcggcga gtccaacctt aggtgactgt gtatccttca aagaccagc 480  
 ccctgcagca ccacaacctc ctggtctgct ctgtgaatgg tttctatcca ggcagcattg 540  
 aagtcagggtg gttccggaac ggccaggaag agaaggctgg ggtggtgtcc acaggcctga 600  
 tccagaatgg agactggacc ttccagacc ttggatgct ggaaacagtt cctcggagtg 660  
 gagaggttta cacctgcaa gtggagcacc caagcatgat gagccctctc acgggtgcaat 720  
 ggagtgcacg gtctgaatct gcacagagca agatgctgag tggagtccgg ggetttgtgc 780  
 tgggcctgct cttccttggg acagggctgt tcactactt caggaatcag aaaggacact 840  
 ctggacttca gccaacagga ctcttgagct gaagtgcaga tgaccacatt caaggaagaa 900  
 ccttctgccc cagctttgca agatgaaaag ctttccact tggctcttat tcttccacaa 960  
 gagctttgtc aggaccaggt tgttactggt tcagcaactc tgcagaaaat gtctccctt 1020  
 gtggcttct tagctcctgt tcttggcctg aagcctcaca gctttgatgg cagtgcctca 1080  
 tcttcaactt ttgtgcttcc ctttacctaa actgtcctgc ctcccggtca tctgtactcc 1140  
 ccttgtgcca cacattgcat tattaatgt ttctcaaaca tggagttaa aaa 1193

<210> 21

<211> 1396

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

atgatcccca ccttcacggc tctgctctgc ctggggctga gtctgggccc caggaccac 60  
 atgcaggcag ggcccctccc caaaccacc ctctgggctg agccaggctc tgtgatcagc 120  
 tgggggaact ctgtgaccat ctggtgtcag gggaccctgg aggctcggga gtaccgtctg 180  
 gataaagagg aaagcccagc accctgggac agacagaacc cactggagcc caagaacaag 240  
 gccagattct ccatccatc catgacagag gactatgag ggagataccg ctgttactat 300  
 cgcagccctg taggctggtc acagcccagt gaccccctgg agctggtgat gacaggagcc 360  
 tacagtaaac ccacccttc agccctgcc agtctctttg tgacctcagg aaagagcgtg 420  
 accctgctgt gtcagtacg gagcccaatg gacactttcc ttctgatcaa ggagcgggca 480  
 gcccatcccc tactgcatct gagatcagag cacggagctc agcagacca ggctgaattc 540  
 cccatgagtc ctgtgacctc agtgcacggg gggacctaca ggtgcttcag ctcacacggc 600  
 ttctcccaact acctgctgtc acaccccagt gaccccctgg agctcatagt ctcaggatcc 660  
 ttggagggtc ccaggcctc accacaagg tccgtctcaa cagctgcagg ccctgaggac 720

ES 2 668 538 T3

cagcccootca tgcctacagg gtcagtcccc cacagtggtc tgagaaggca ctgggaggta 780  
 ctgatcgggg tcttggtggt ctccatcctg cttctctccc tctcctctt cctcctcctc 840  
 caacactggc gtcagggaaa acacaggaca ttggccocaga gacaggctga tttccaacgt 900  
 cctccagggg ctgccgagcc agagcccaag gacgggggcc tacagaggag gtccagccca 960  
 gctgctgacg tccagggaga aaacttctgt gctgccgtga agaacacaca gcctgaggac 1020  
 ggggtggaaa tggacactcg gagcccacac gatgaagacc cccaggcagt gacgtatgcc 1080  
 aaggtgaaac actccagacc taggagagaa atggcctctc ctccctccc actgtctggg 1140  
 gaattcctgg acacaaagga cagacaggca gaagaggaca gacagatgga caotgaggct 1200  
 gctgcatctg aagccccca ggatgtgacc tacgcccage tgcacagctt taccctcaga 1260  
 cagaaggcaa ctgagcctcc tccatcccag gaaggggcct ctccagctga gccagtgctc 1320  
 tatgccactc tggccatcca ctaatccagg ggggaccag accccacaag ccatggagac 1380  
 tcaggacccc agaagg 1396

<210> 22

<211> 2221

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

gctcactgcc acacgcagct cagcctgggc ggcacagcca gatgcgagat gogtctctgc 60  
 tgatctgagt ctgcctgcag catggacctg ggtcttccct gaagcatctc cagggctgga 120  
 gggacgactg ccatgcaccg agggctcact catccgcaga gcagggcagt gggaggagac 180  
 gccatgaacc ccatcgtcac agtcctgata tgtctcgggc tgagtctggg cccaggacc 240  
 cacgtgcaga cagggaccat cccaagccc accctgtggg ctgagccaga ctctgtgata 300  
 acccagggga gtcccgtcac cctcagttgt caggggagcc ttgaagcca ggagtaccgt 360  
 ctatataggg agaaaaaatc agcatcttg attacacgga tacgaccaga gcttgtgaag 420  
 aacggccagt tccacatccc atccatcacc tgggaacaca cagggcgata tggctgtcag 480  
 tattacagcc gcgctcgggt gtctgagctc agtgaccccc tggctgtggt gatgacagga 540  
 gcctacccaa aaccaccct ctacagcccag cccagccctg tggtagcctc aggaggaagg 600  
 gtgaccctoc agtgtgagtc acaggtggca tttggcggct tcattctgtg taaggaagga 660  
 gaagatgaac acccacaatg cctgaactcc cagcccatg ccogtgggtc gtcccgcgcc 720  
 atcttctccg tgggccccgt gagcccgaat cgcaggtggt cgcacagggt ctatggttat 780  
 gacttgaact ctccctatgt gtggtcttca cccagtgata tcttgagct cctggtccca 840  
 ggtgtttcta agaagccatc actctcagtg cagccgggtc ctgtcgtggc cctggggaa 900

ES 2 668 538 T3

agcctgacc tccagtgtgt ctctgatgtc ggctatgaca gatttgttct gtacaaggag 960  
 ggggaacgtg accttcgcca gctccctggc cggcagcccc aggctgggct ctcccaggcc 1020  
 aacttcaccc tgggcccctgt gagccgctcc tacggggggcc agtacagatg ctacgggtgca 1080  
 tacaacctct cctccgagtg gtcggccccc agcgaccccc tggacatcct gatcacagga 1140  
 cagatccatg gcacaccctt catctcagtg cagccaggcc ccacagtggc ctcaggagag 1200  
 aacgtgaccc tgctgtgtca gtcatggcgg cagttccaca ctttccttct gaccaaggcg 1260  
 ggagcagctg atgccccact ccgtctaaga tcaatacacg aatatacctaa gtaccaggct 1320  
 gaattcccca tgagtctctg gacctcagcc caccggggga cctacaggtg ctacgggtca 1380  
 ctcaactcog acccctacct gctgtctcac cccagtgagc ccctggagct cgtgggtctca 1440  
 ggaccctcca tgggttccag cccccaccc accggtccca tctccacacc tgcaggccct 1500  
 gaggaccagc cctcacccc cactgggtcg gatccccaaa gtggtctggg aaggcacctg 1560  
 ggggttgtga toggcatctt ggtggccgtc gtcctactgc tctcctcct cctcctcctc 1620  
 ttctcatcc tccgacatcg acgtcagggc aaacactgga catcgacca gagaaaggct 1680  
 gatttccaac atcctgcagg ggtgtgggg ccagagccca cagacagagg cctgcagtgg 1740  
 aggtccagcc cagctgccga cgcccaggaa gaaaacctct atgctgccgt gaaggacaca 1800  
 cagcctgaag atgggggtgga gatggacact cgggctgctg catctgaagc ccccaggat 1860  
 gtgacctag cccagctgca cagcttgacc ctgagacgga aggcaactga gcctcctcca 1920  
 tcccaggaaa gggaacctcc agctgagccc agcatctacg ccaccctggc catccactag 1980  
 cccggagggt acgcagactc cacactcagt agaaggagac tcaggactgc tgaaggcacg 2040  
 ggagctgccc ccagtggaca ccaatgaacc ccagtcagcc tggaccoccta acaaagacca 2100  
 tgaggagatg ctgggaactt tgggactcac ttgattctgc agtcgaaata actaatatcc 2160  
 ctacatTTTT taattaaagc aacagacttc tcaataaaag caggctgtct cgttccaatc 2220  
 t 2221

**REIVINDICACIONES**

1. Método *in vitro* de activación o estimulación de células T, comprendiendo el método poner en contacto dichas células T con una célula K562 transducida usando un vector lentiviral que expresa CD64 y 4-1BBL, en el que dicha célula K562 está cargada con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, y en el que la unión de dicho anticuerpo anti-CD3 y dicho anticuerpo anti-CD28 con dichas células T activa o estimula dichas células T.
2. Célula K562 transducida usando un vector lentiviral que expresa CD64 y 4-1BBL, en la que dicha célula K562 está cargada con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, para su uso en la activación o estimulación de células T.

5  
10

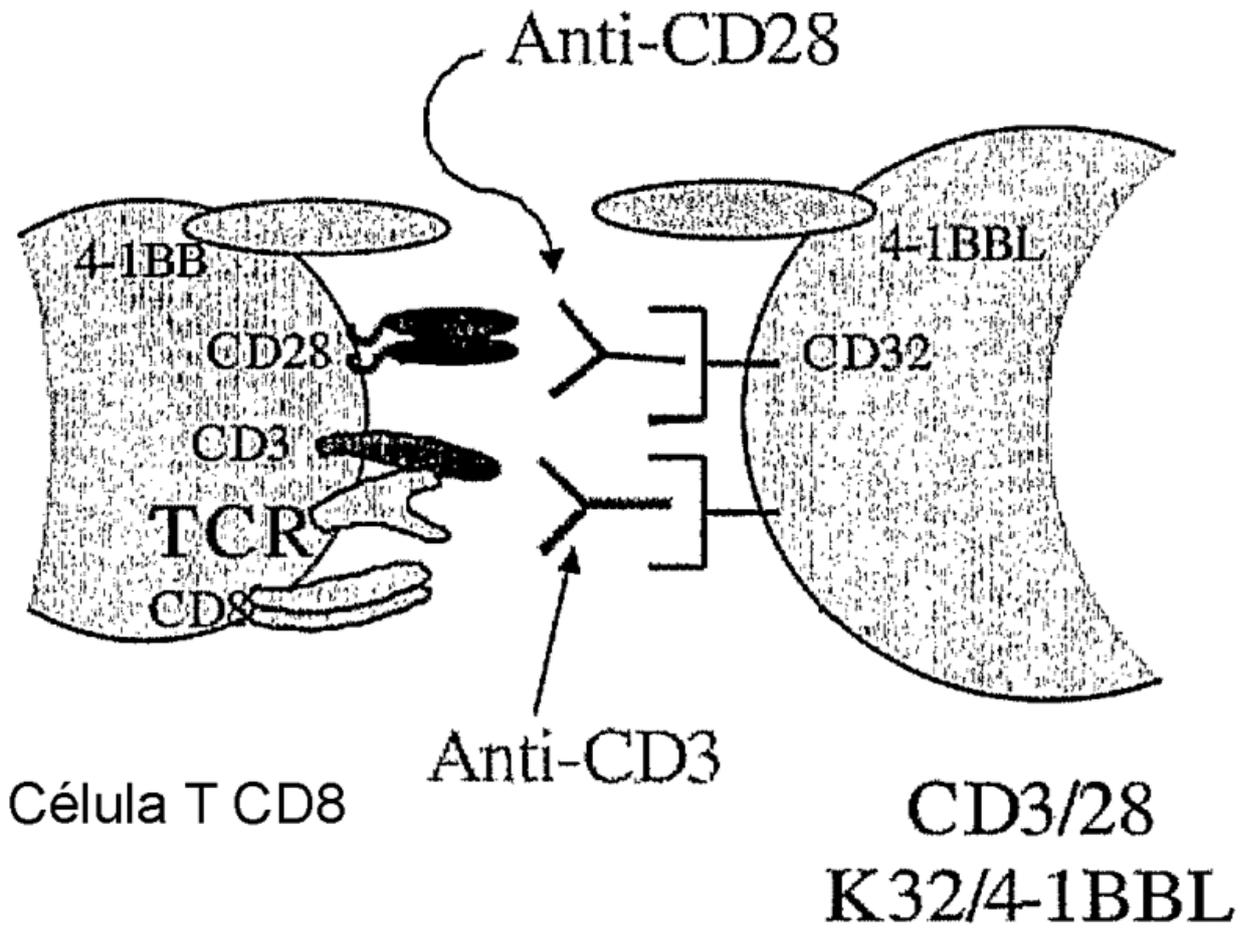


FIG. 1

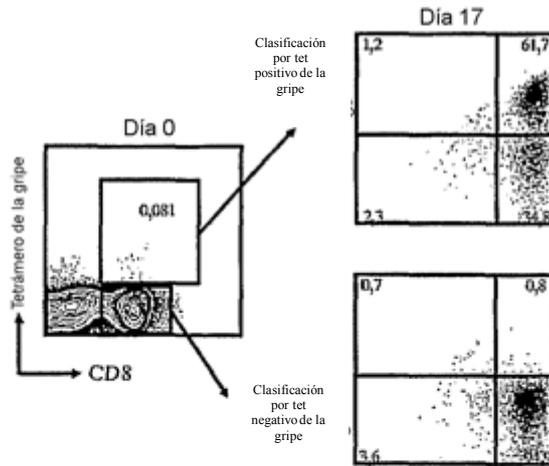


FIG. 2A

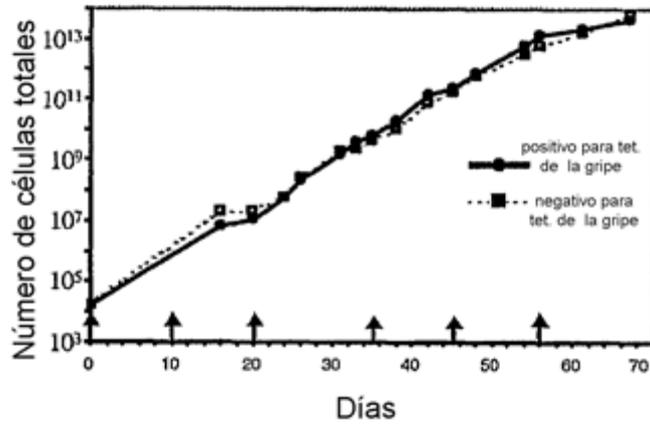


FIG. 2B

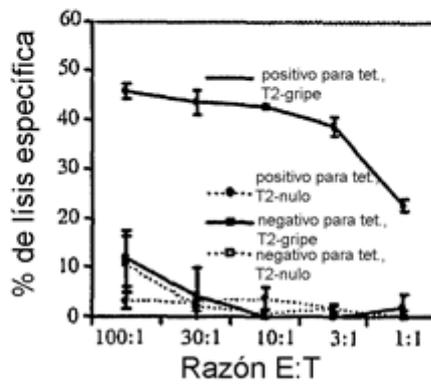


FIG. 2C

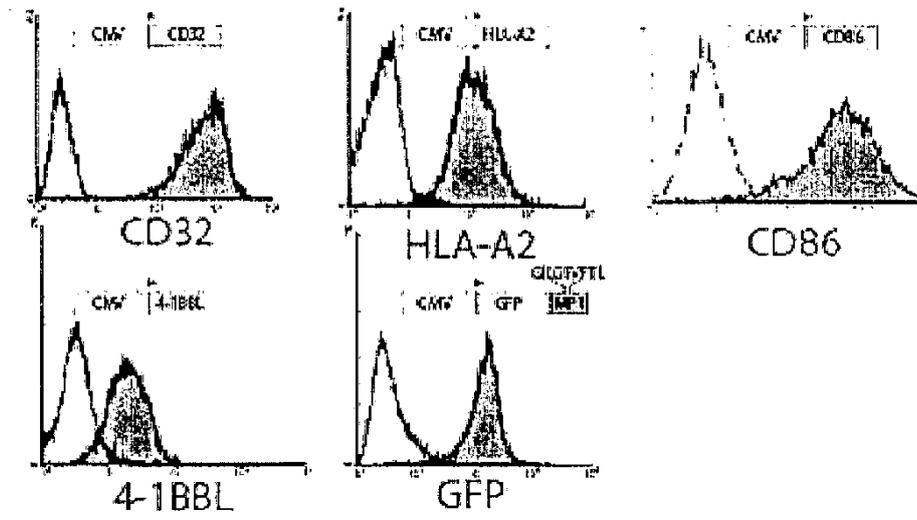


FIG. 3

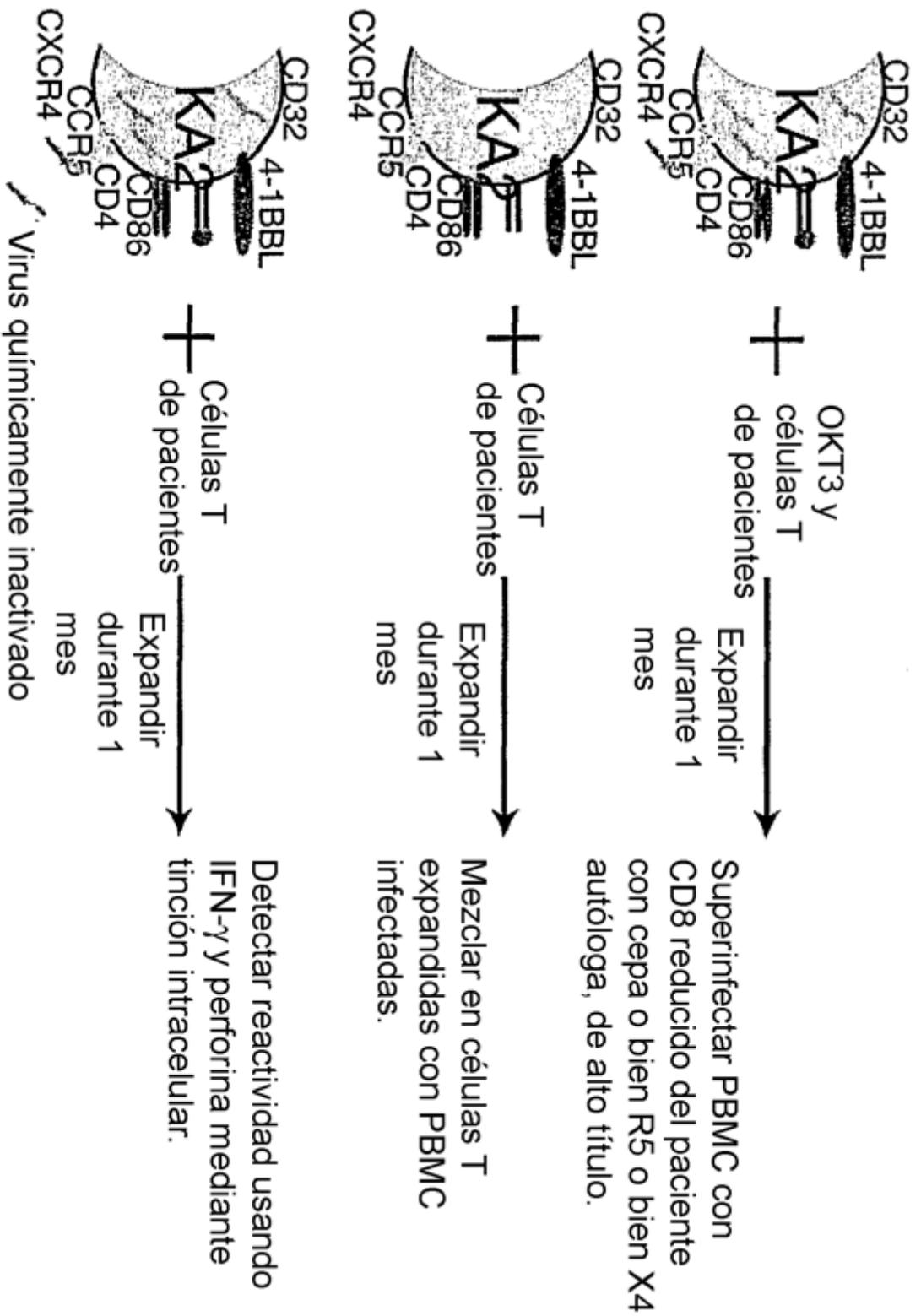


FIG. 4

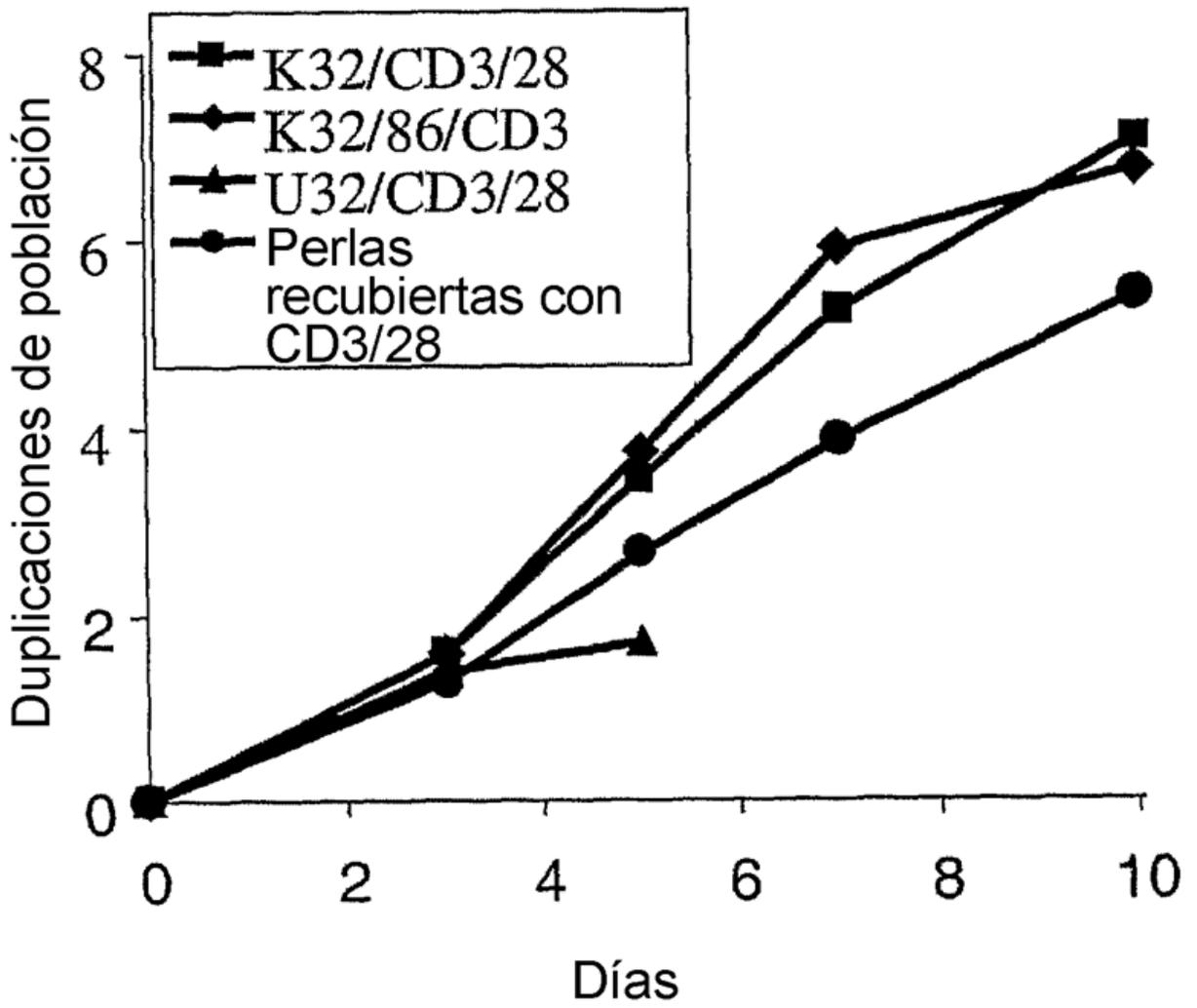


FIG. 5

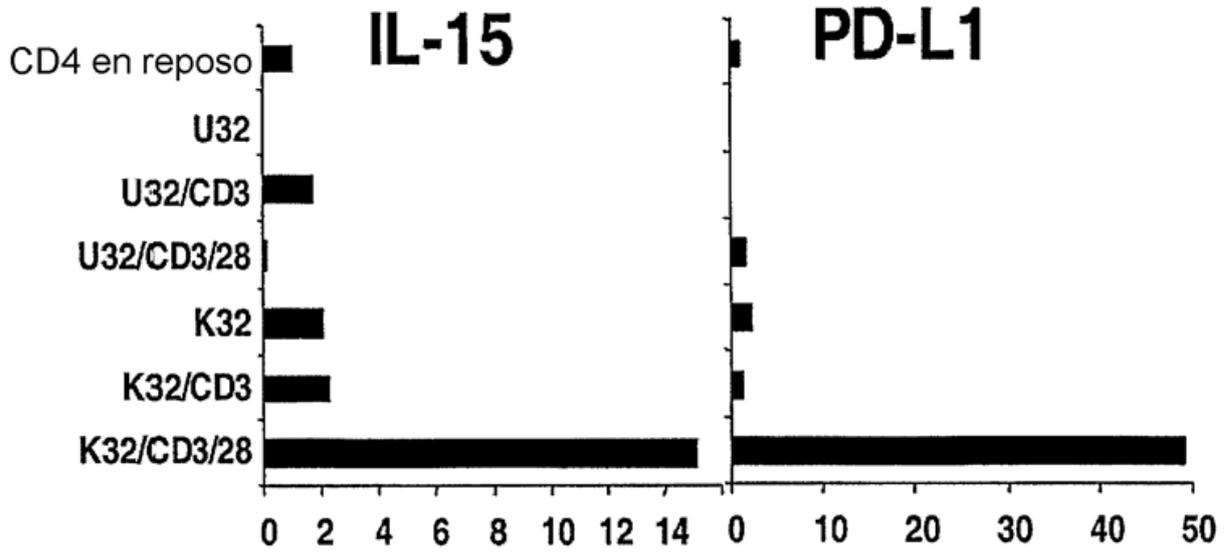


FIG. 6A

FIG. 6B

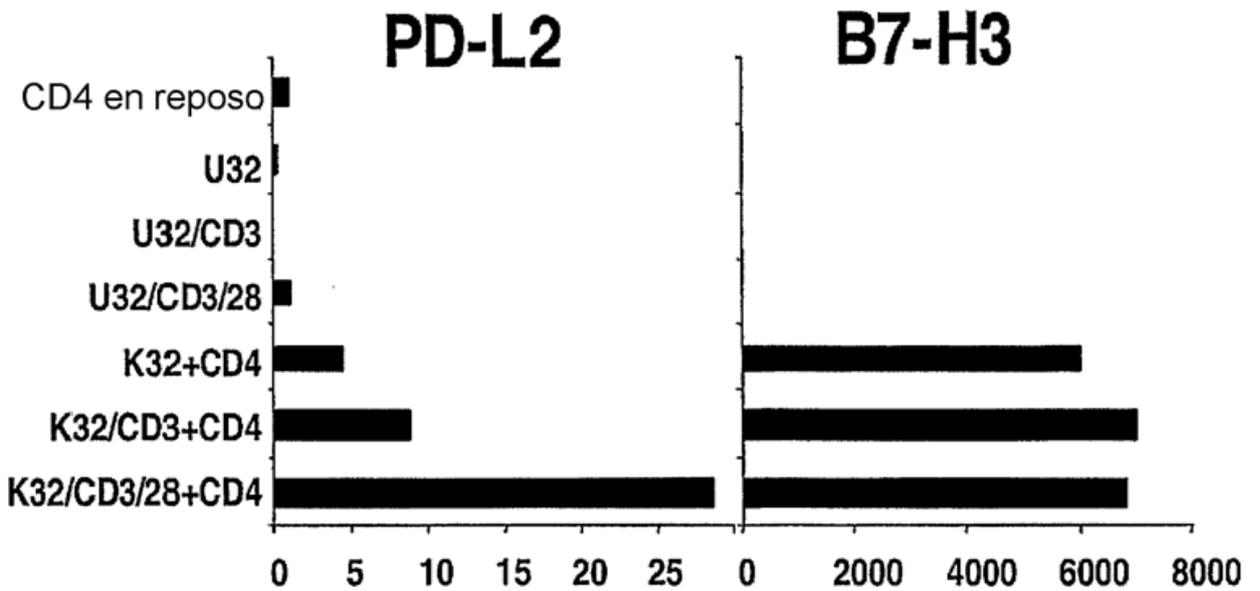


FIG. 6C

FIG. 6D

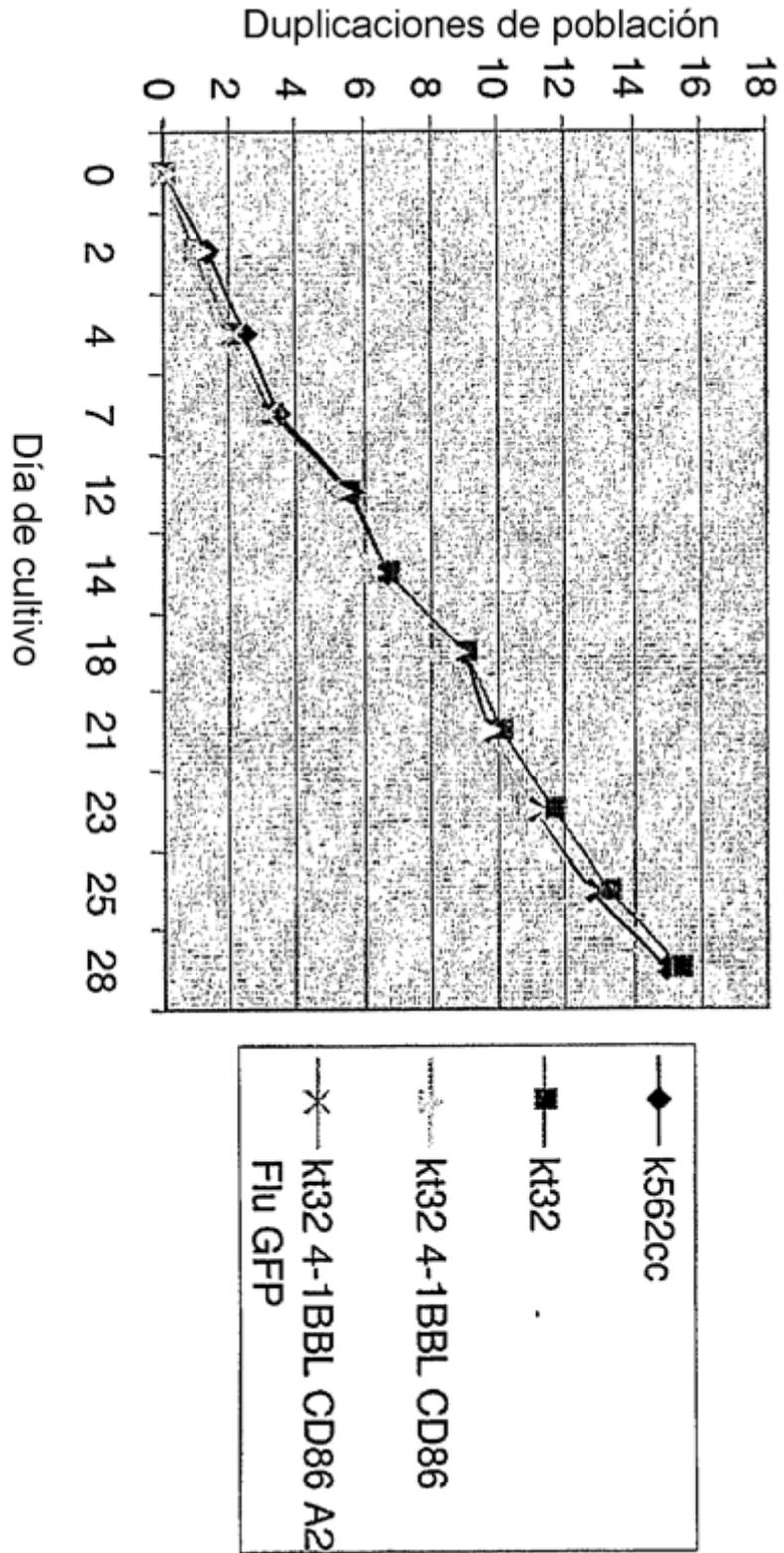


FIG. 7

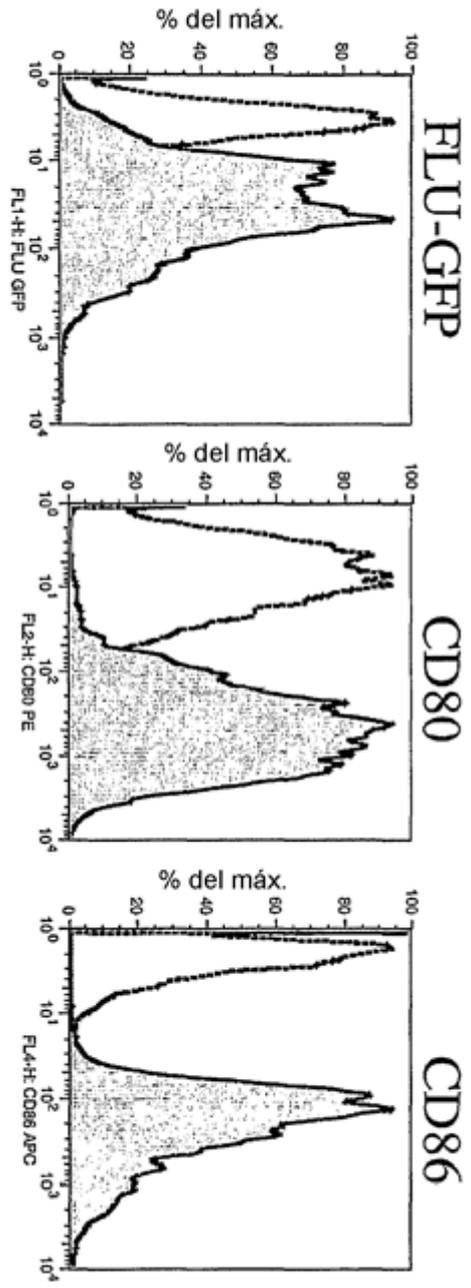


FIG. 8A  
4-1BBL

FIG. 8B

FIG. 8C

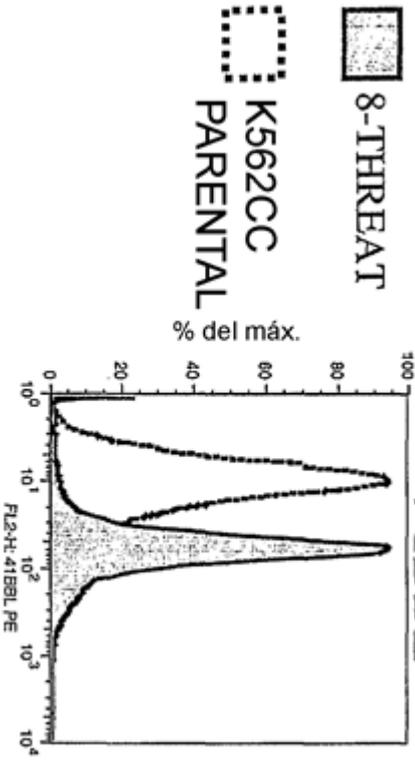


FIG. 8D

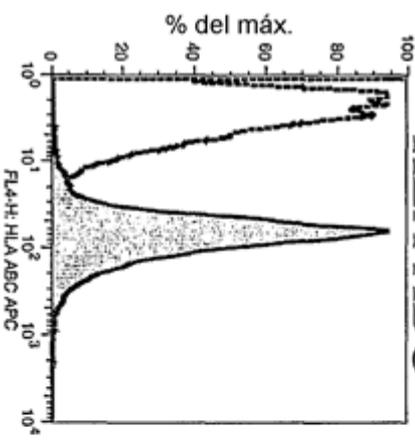


FIG. 8E

\* TAMBIÉN  
EXPRESA  
CD32, CD83,  
CD40L

### Expansión a largo plazo de células T CD8 usando aAPC transducidas con LV

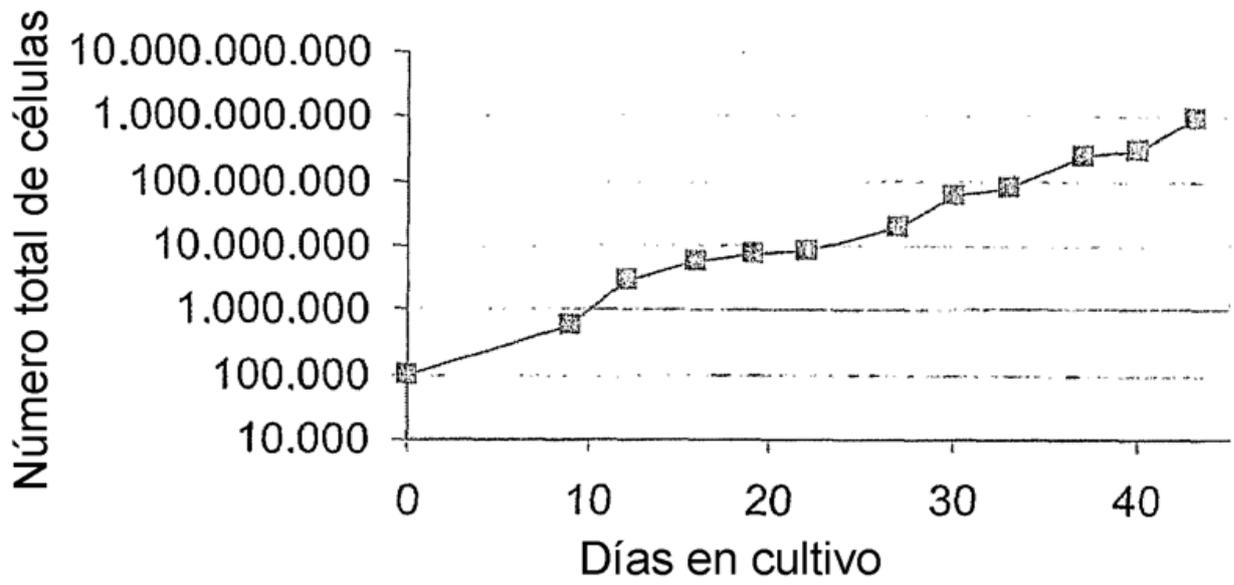
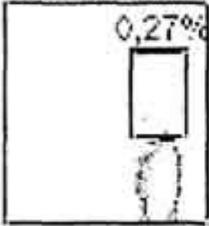


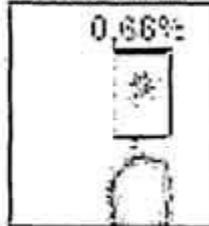
FIG. 9

**FIG. 10A**  
Antes de la clasificación



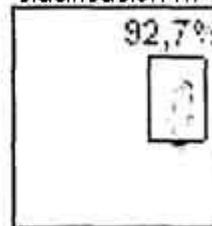
CD8

**FIG. 10B**  
Tras la clasificación n.º 1

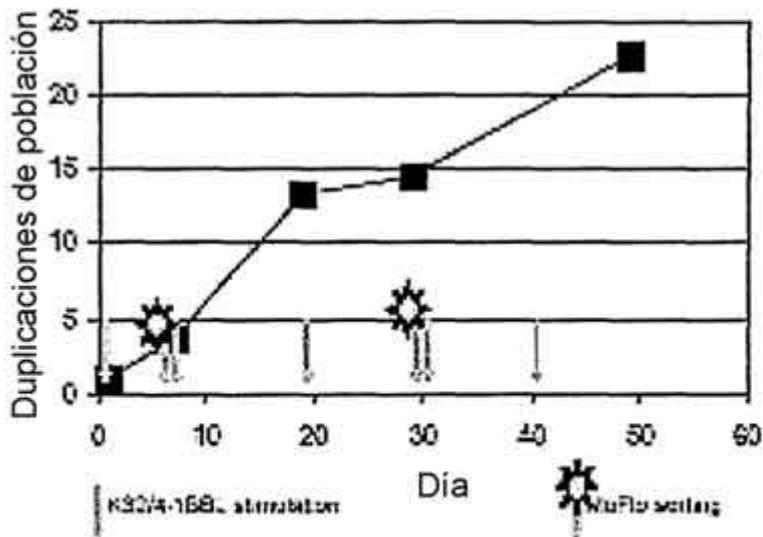


CD8

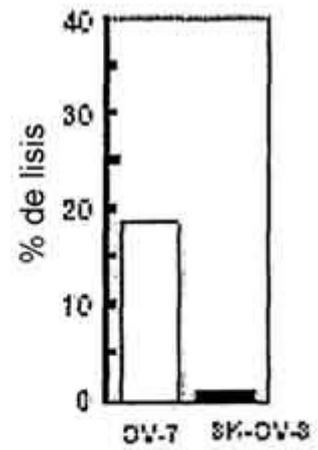
**FIG. 10C**  
Tras la clasificación n.º 2



CD8



**FIG. 10D**



**FIG. 10E**

FIG. 11A

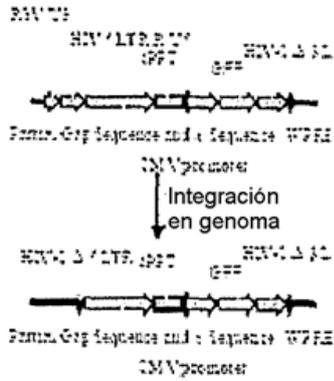


FIG. 11B

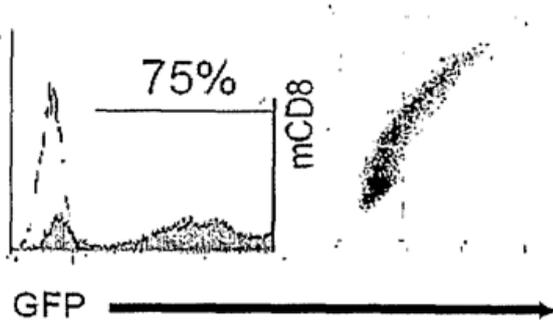


FIG. 11C

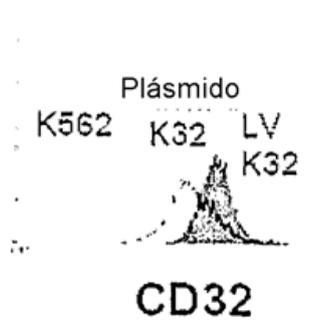


FIG. 11D

FIG. 12A

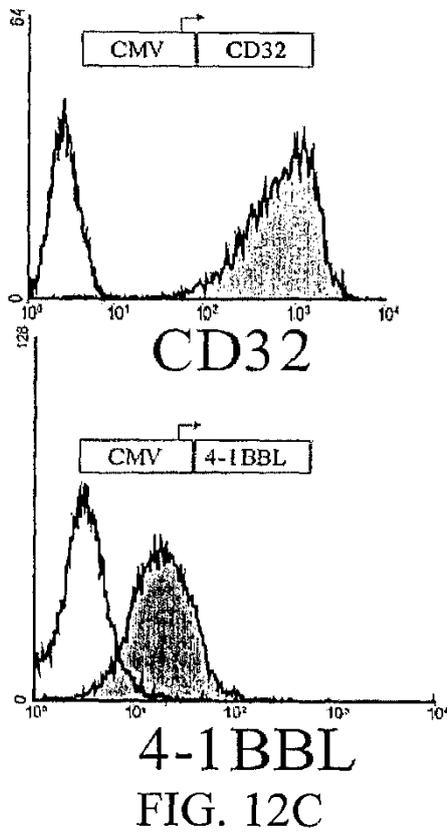
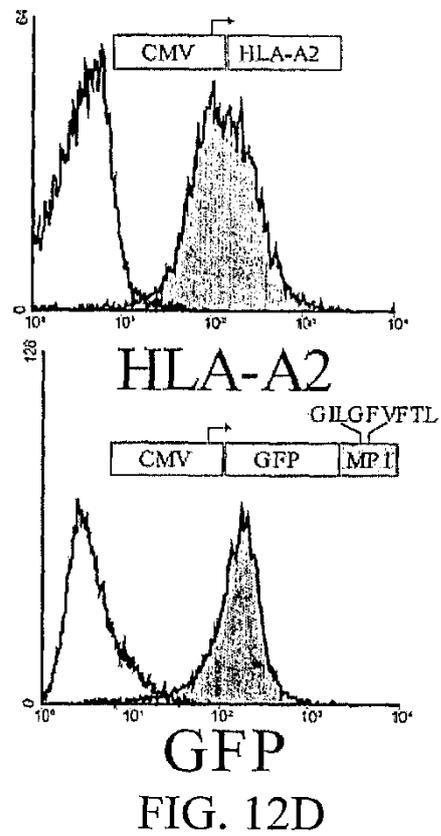
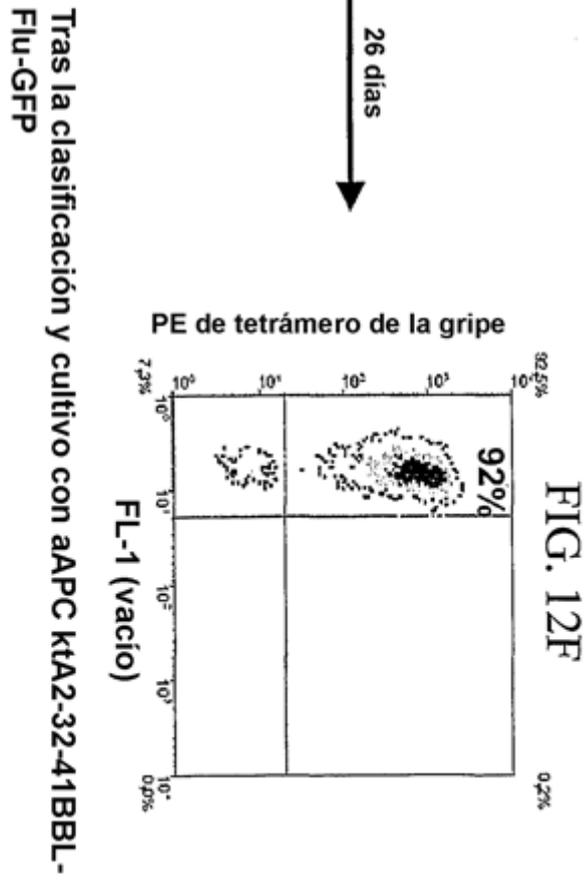
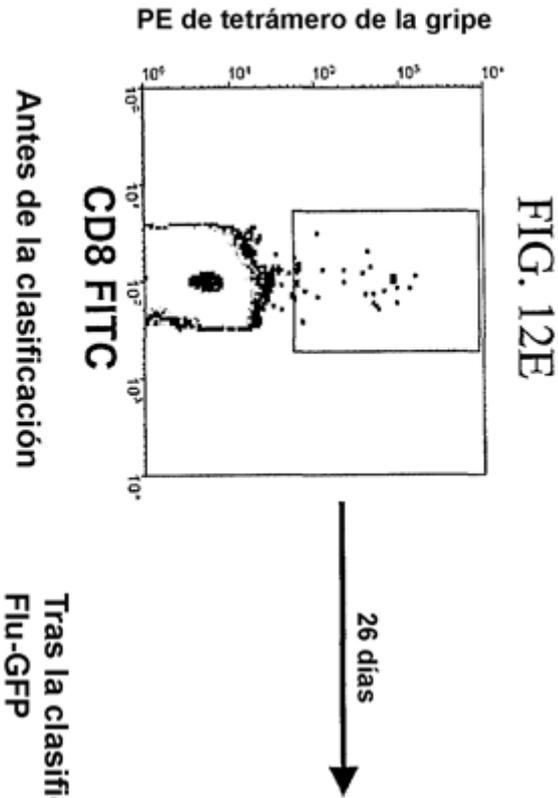


FIG. 12B





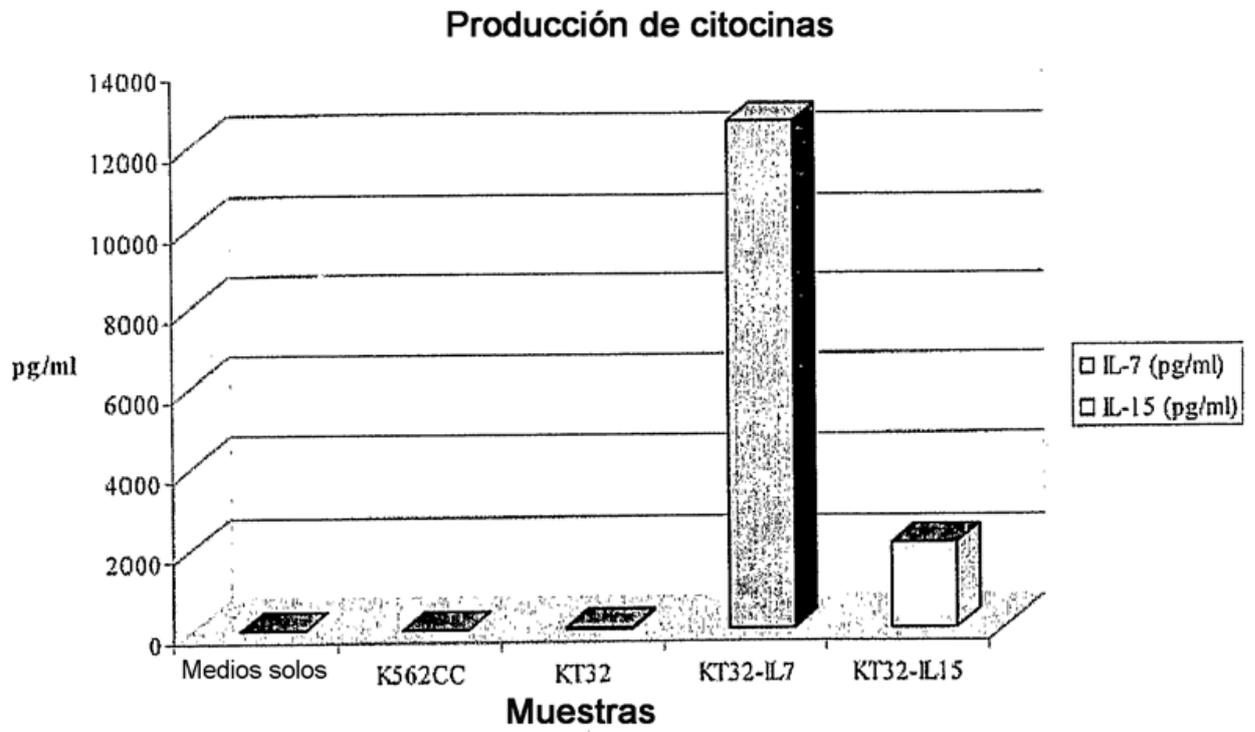


FIG. 13

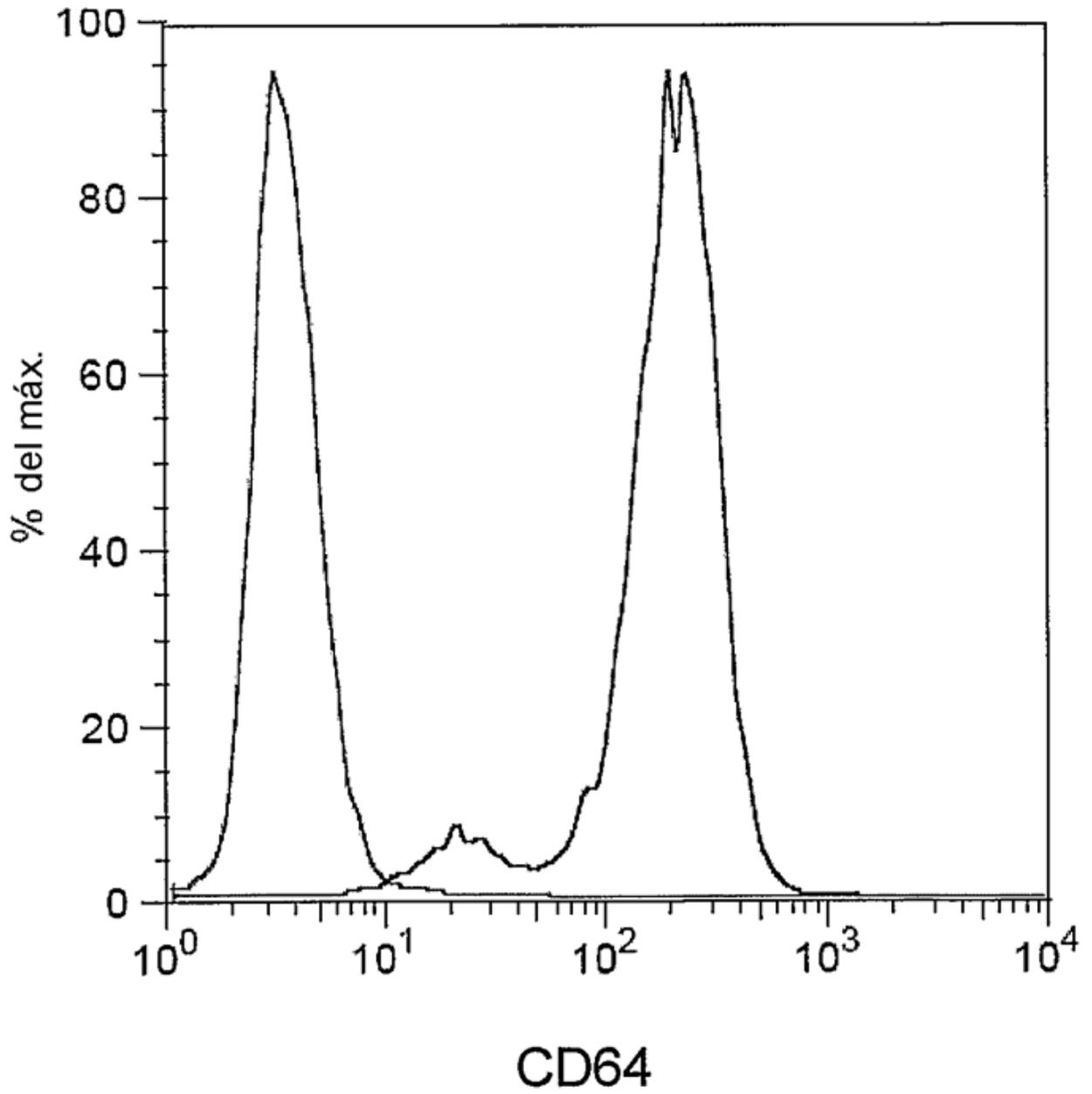


FIG. 14

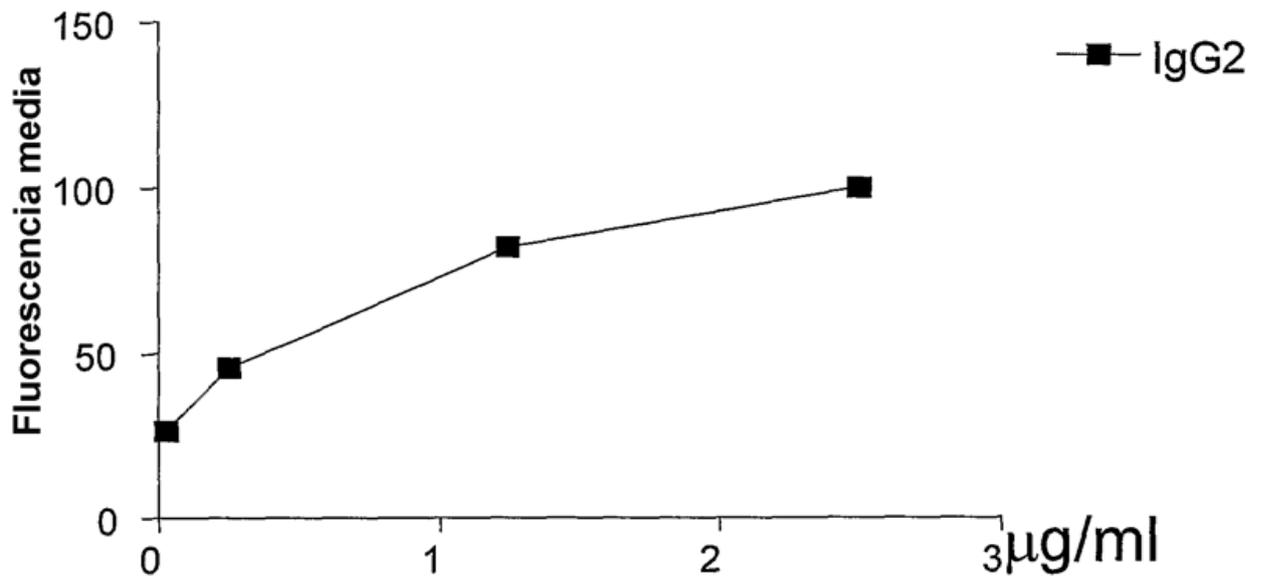
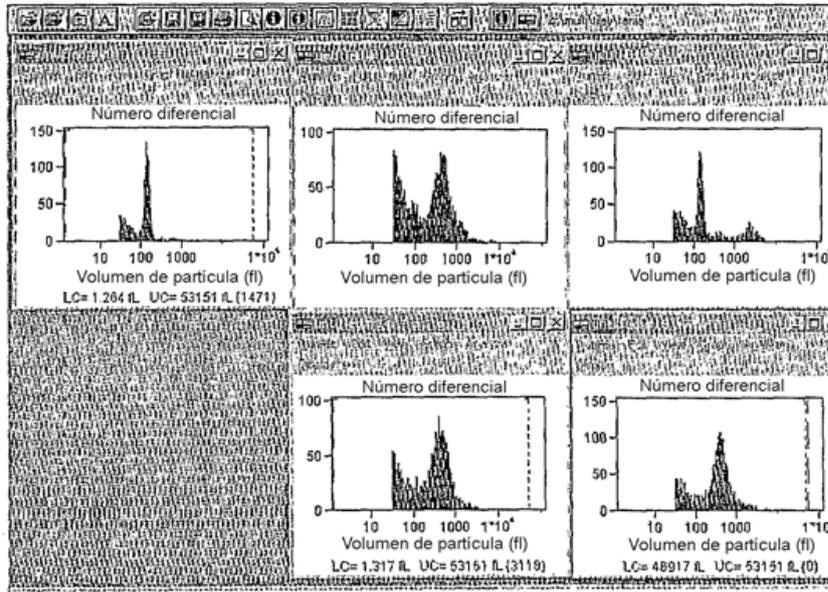


FIG. 15

Control



CD32

CD64

Sin lavado Lavado 3 veces

FIG. 16

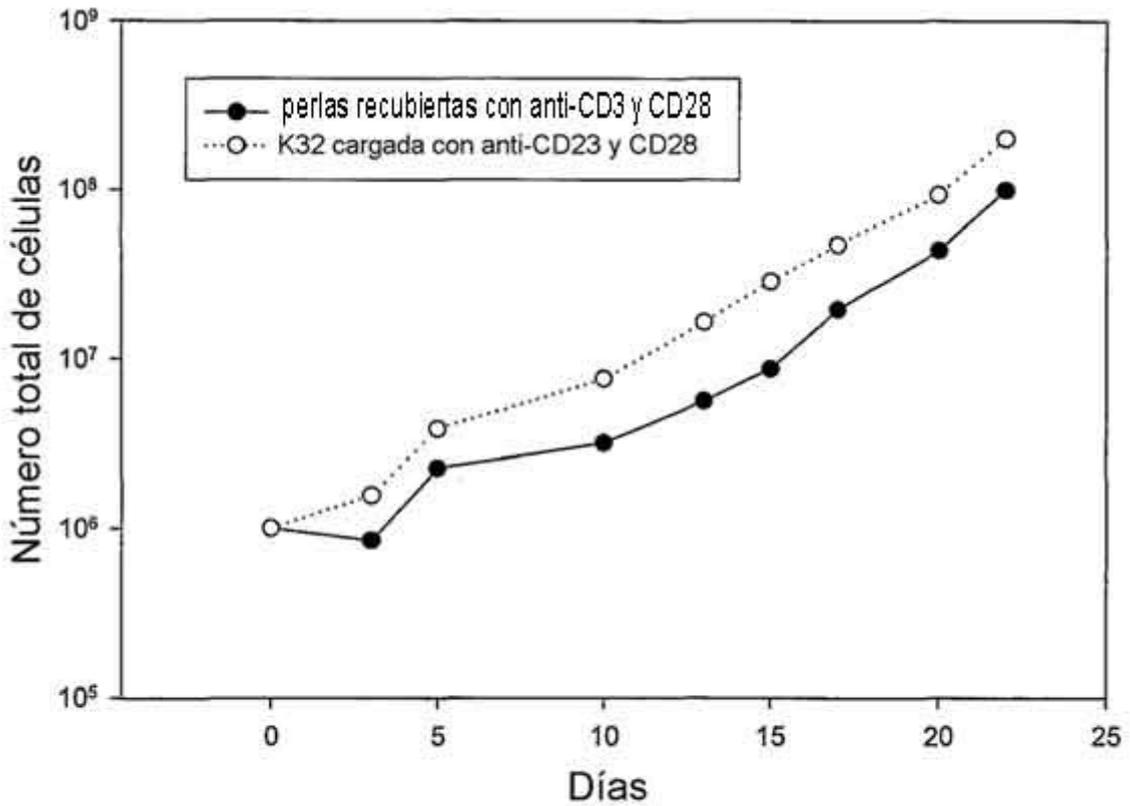
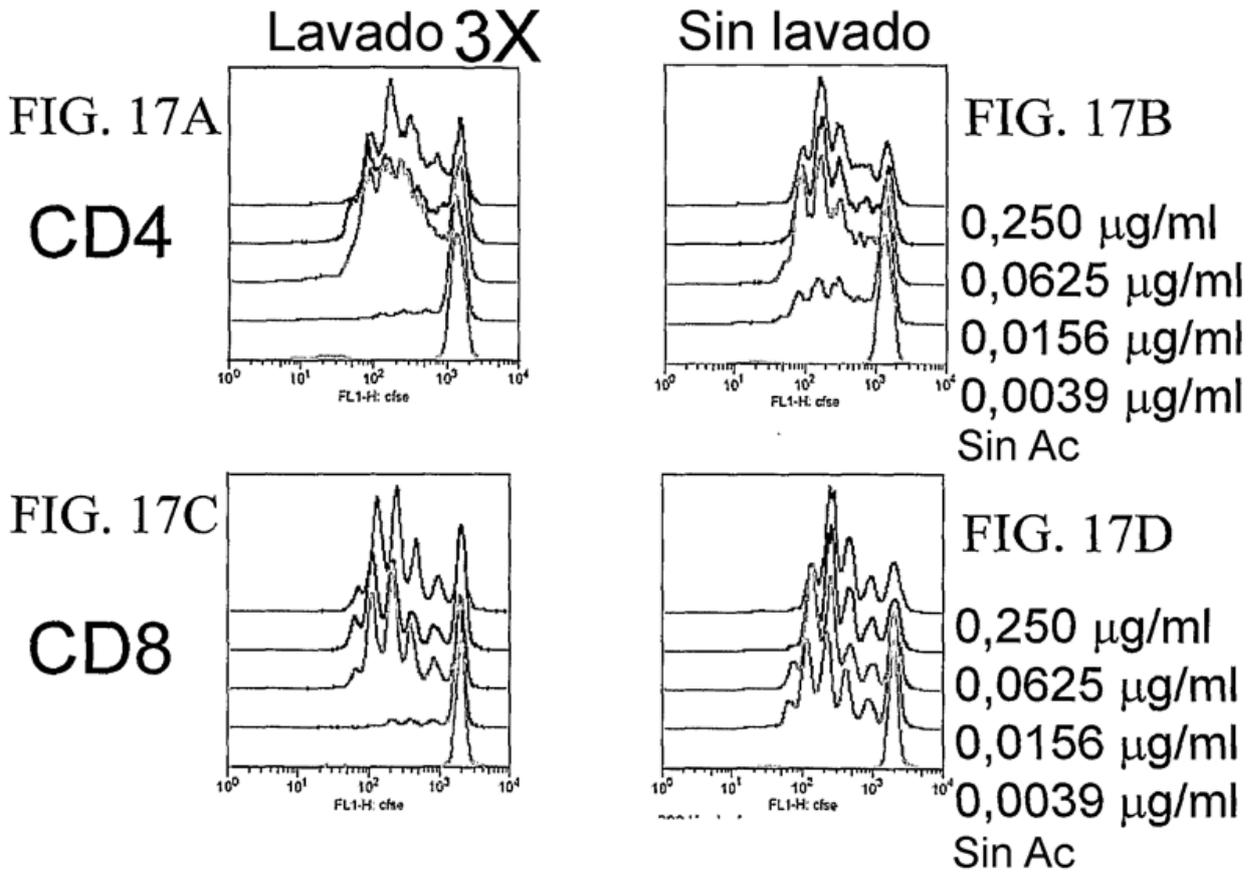


FIG. 18

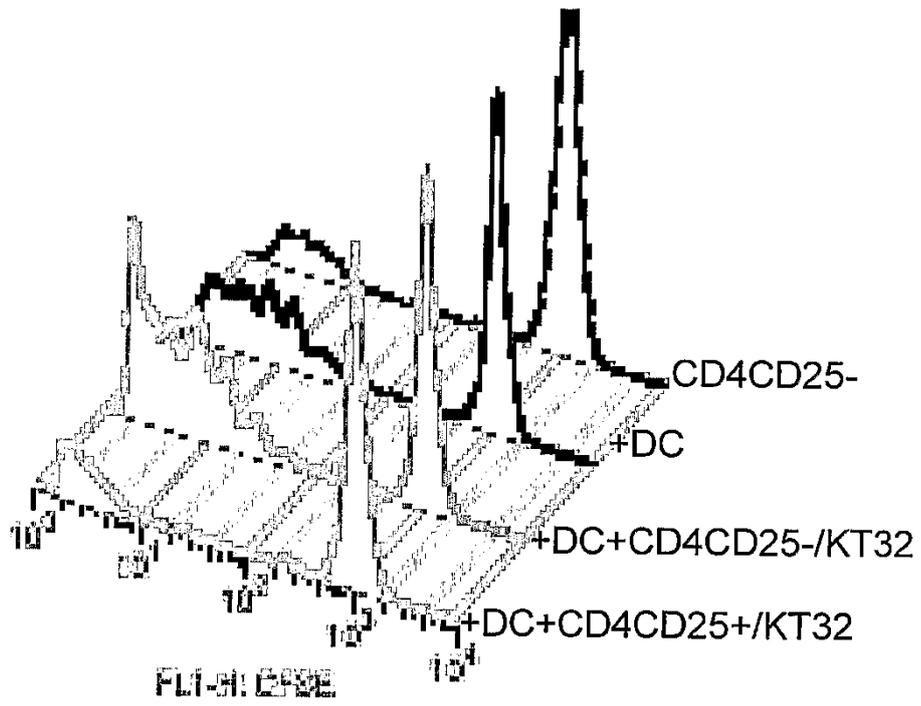


FIG. 19

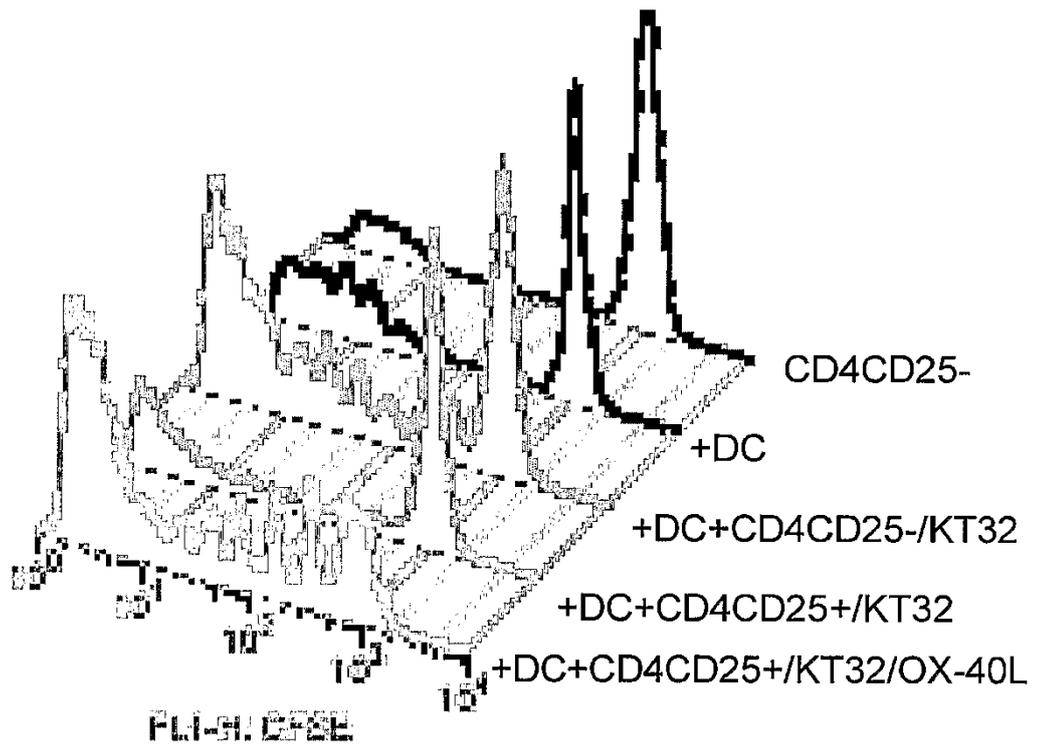


FIG. 20

FIG. 21A

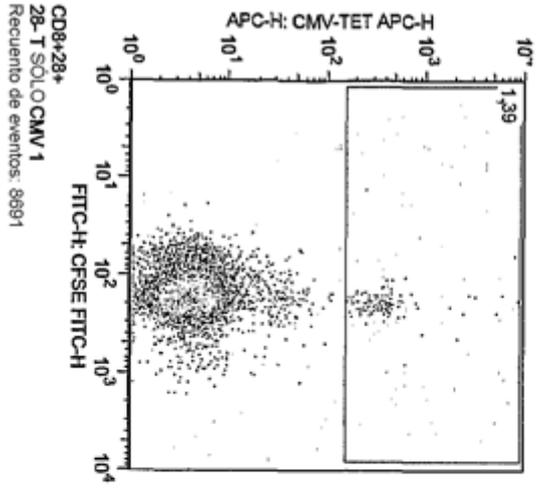


FIG. 21B

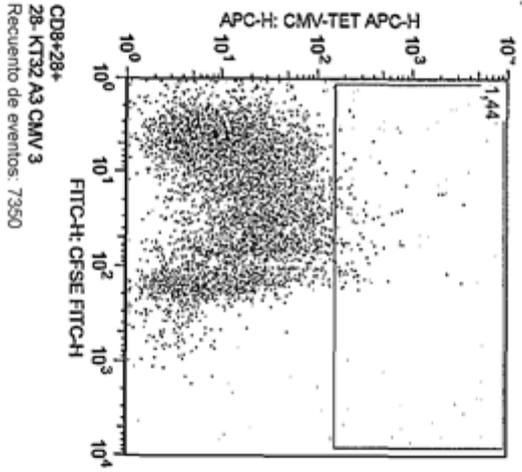


FIG. 21C

