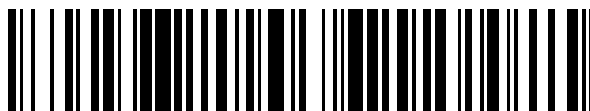


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 756**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

A01N 63/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2007** **PCT/US2007/021830**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2008** **WO08066609**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2007** **E 07852711 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 2099902**

54 Título: **Transferencia adoptiva de clones de células T CD8⁺ derivadas de células de memoria central**

30 Prioridad:

30.11.2006 US 867880 P

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

11.10.2018

73 Titular/es:

**FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH
CENTER (100.0%)
1100 FAIRVIEW AVENUE N. M/S J6-200
SEATTLE, WA 98109-1024, US**

72 Inventor/es:

**RIDDELL, STANLEY R.;
BERGER, CAROLINA y
JENSEN, MICHAEL C.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 685 756 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

Transferencia adoptiva de clones de células T CD8⁺ derivadas de células de memoria central

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con métodos y composiciones para llevar a cabo la inmunoterapia adoptiva.

Antecedentes de la invención

10

Estudios en roedores han demostrado que la inmunoterapia adoptiva con células T con especificidad antigénica es eficaz para el tratamiento del cáncer e infecciones, y existe evidencia de que esta modalidad tiene actividad terapéutica en los seres humanos¹⁻⁸. Para las aplicaciones clínicas, es necesario aislar las células T de una especificidad antigénica deseada o modificar las células T para que expresen receptores que se dirijan a células infectadas o transformadas, y después expandir estas células en cultivo⁹⁻¹⁴. La transferencia de los clones de células T es un enfoque atractivo porque permite el control de la especificidad y la función, y facilita la evaluación de la persistencia, la toxicidad y la eficacia in vivo. Adicionalmente, en el contexto del trasplante de células madre alogénicas, la administración a los receptores, de los clones de células T del donante que se dirigen a los patógenos objetivos o a las células malignas puede evitar la enfermedad del injerto contra el huésped que se produce con la infusión de células T no seleccionadas del donante^{3,4,15}. Sin embargo, a partir de los estudios clínicos es evidente que la eficacia de las células T cultivadas, particularmente las células T CD8⁺ clonadas, frecuentemente se limita porque no persisten después de la transferencia adoptiva^{16,17}.

15

20

25

El grupo de linfocitos a partir de los cuales pueden derivarse las células T CD8⁺ para la inmunoterapia adoptiva contienen células T de memoria, vírgenes y de larga duración, con experiencia con el antígeno (T_M). Las T_M pueden dividirse adicionalmente en subconjuntos de células de memoria central (T_{CM}) y de memoria efectoras (T_{EM}) que difieren en el fenotipo, las propiedades de direccionamiento y la función¹⁸. Las células T_{CM} CD8⁺ expresan CD62L y CCR7, que promueven la migración hacia los nodulos linfáticos, y proliferan rápidamente si se vuelven a exponer al antígeno. Las T_{EM} CD8⁺ carecen de CD62L lo que permite la migración a los tejidos periféricos, y muestra una función efectora inmediata¹⁹.

30

En respuesta a la estimulación con antígenos, las T_{CM} CD8⁺ y las T_{EM} se diferencian en células T efectoras citolíticas (T_E) que expresan un alto nivel de granzimas y perforina, pero son de corta duración²⁰. Por lo tanto, la poca supervivencia de las células T en los ensayos clínicos de inmunoterapia puede ser simplemente el resultado de su diferenciación durante el cultivo in vitro a T_E que están destinadas a morir^{17,21,22}.

35

Resumen de la invención

La invención proporciona un método para obtener una preparación de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ de primates, útil para la inmunoterapia adoptiva como se expone en las reivindicaciones 1 a 5 y 10.

40

La invención proporciona, además, una preparación de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ de primates como se expone en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 y 10.

45

La invención proporciona además una preparación de CTL CD8⁺ para usar en la inmunoterapia adoptiva como se expone en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15.

50

En la presente se describe un método para llevar a cabo una inmunoterapia adoptiva en un sujeto primate que lo necesite mediante la administración al sujeto de una preparación de linfocitos T citotóxicos (CTL) en una cantidad eficaz para el tratamiento. El método descrito comprende administrar como la preparación de CTL una preparación que consiste esencialmente en una población de CTL de primate, expandida *in vitro* (por ejemplo, cultivada *in vitro* durante 1, 2, o 3 días hasta 3 o 4 semanas o más), la población de CTL se enriquece de linfocitos T de memoria central antes de la expansión, y se agota de linfocitos T de memoria efectoras antes de la expansión. El método puede comprender, además, administrar simultáneamente interleucina 15 al sujeto en una cantidad eficaz para aumentar la proliferación de las células T de memoria central en el sujeto.

55

En la presente se describe, además, una formulación farmacéutica que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en una población de linfocitos T citotóxicos (CTL) de primate, expandida *in vitro*, la población de CTL se enriquece de linfocitos T de memoria central antes de la expansión, y se agota de linfocitos T de memoria efectoras antes de la expansión.

60

Se describe además el uso de una formulación como se describe en la presente para la preparación de un medicamento para llevar a cabo un método como se describe en la presente (por ejemplo, tratar un cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto humano, o primate).

65

Una preparación de CTL (o población) puede producirse mediante el proceso de: (a) obtener una primera población de CTL a partir de un donante; (b) separar una subpoblación de CTL enriquecida de linfocitos T de memoria central CD62L⁺ y

agotada de linfocitos T de memoria efectoras CD62L⁻ para producir una subpoblación de CTL enriquecida de los de memoria central; (c) expandir la subpoblación de CTL enriquecida de los de memoria central *in vitro* en un medio de cultivo (por ejemplo, durante 1, 2, o 3 días hasta 3 o 4 semanas o más); y después (d) recolectar las células del medio de cultivo para producir la preparación de CTL. La etapa de separación "b" puede llevarse a cabo de la siguiente manera: (i) poner en contacto la primera población de CTL con un anticuerpo anti-CD62L, en donde el anticuerpo se inmoviliza en un soporte sólido, de manera que las células de memoria central se unan al soporte; después (ii) separar el soporte de la población de CTL con las células de memoria central unidas a él; (iii) y después separar las células de memoria central del soporte sólido para producir la subpoblación de CTL enriquecida con células de memoria central. La etapa de expansión "c" puede comprender, además, administrar interleucina 15 a la subpoblación de memoria central *in vitro*.

Las células T enriquecidas con las de memoria central pueden modificarse *in vitro* con al menos un gen que dirige (por ejemplo, se une específicamente) a células cancerosas u otras células patogénicas en el sujeto.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Aislamiento y modificación genética de los clones de células T CD8⁺ específicas para CMV a partir de subconjuntos de células T CD62L⁻ y CD62L⁺ para la transferencia adoptiva.

Figura 1a. Las células T de memoria específicas para IE de CMV están presentes en los subconjuntos CD62L⁺ y CD62L⁻ de los linfocitos CD8⁺ de sangre periférica. Las PBMC se clasificaron en las fracciones CD62L⁻CD8⁺ y CD62L⁺CD8⁺ después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L (paneles superiores). Las fracciones CD62L⁻ y CD62L⁺ se estimularon durante 6 horas con células B autólogas activadas con CD40L sometidas a pulsos con medio solo o con péptido IE de CMV. La brefeldina A se añadió durante las 4 horas finales y las células T CD8⁺ que produjeron IFN- γ se detectaron mediante tinción para IFN- γ intracelular. Los paneles izquierdos inferiores muestran la producción de IFN- γ por el subconjunto CD62L⁻CD8⁺ y los paneles derechos inferiores muestran la producción de IFN- γ por el subconjunto CD62L⁺CD8⁺. Se muestran los datos del macaco 02269 y son representativos de los datos obtenidos en cuatro macacos consecutivos.

Figura 1b. Estrategia para el aislamiento de clones de células T CD8⁺ específicas para CMV a partir de los subconjuntos de T_{EM} CD62L⁻ y T_{CM} CD62L⁺. Se obtuvieron alícuotas de PBMC de cada macaco y se clasificaron en las fracciones CD62L⁻CD8⁺ y CD62L⁺CD8⁺ después de la tinción con los anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. Las células T clasificadas se cultivaron con monocitos autólogos sometidos a pulsos con el péptido IE de CMV y después de 1 semana de estimulación, las células T de los cultivos se clonaron mediante dilución limitante. Los clones de células T se tamizaron para identificar los que lisaron las células objetivo autólogas sometidas a pulsos con péptido, y después se transdujeron con un vector retroviral que codificaba una molécula Δ CD 19 o CD20 de la superficie celular. Los clones de células T individuales se expandieron *in vitro* a $> 5 \times 10^9$ células mediante estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en cultivos suplementados con PBMC humanas γ -irradiadas y EBV-LCL antes de la transferencia adoptiva.

Figura 1c. Construcciones de vectores retrovirales que codifican genes marcadores de la superficie celular de macacos. Abreviaturas: MPSV-LTR, repetición terminal larga retroviral del virus de sarcoma mieloproliferativo; Ψ +, señal de empaquetamiento extendida; PRE, elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de Woodchuck; Δ CD19, ADNc truncado de CD19 de macaco que codifica los dominios extracelular y de transmembrana, y 4 aa de la cola citosólica; CD20, ADNc de CD20 de longitud completa de macaco. (d) Selección por perlas inmunomagnéticas de los clones de células T CD8⁺ modificadas con Δ CD19 y CD20. Las células T transducidas se enriquecieron para células que expresan Δ CD19 o CD20 en el día 8 después de la transducción mediante el uso de una selección inmunomagnética de dos etapas con anticuerpos anti-CD 19 o anti-CD20 y microperlas acopladas a anticuerpos de rata anti-IgG de ratón. Después de la selección se retiraron alícuotas de células T no modificadas (paneles izquierdos) y modificadas con Δ CD19 o CD20 (paneles derechos), se cotificaron con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD 19 o anti-CD20, y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar la pureza. Se indican los porcentajes de células T CD8⁺ positivas para el transgén.

Figura 2. Los clones de células T CD8⁺ específicas para CMV que se derivan de los subconjuntos T_{CM} y T_{EM} muestran un fenotipo efector, y avidez y proliferación comparables *in vitro*.

Figura 2a. Se examinaron clones individuales de células T CD8⁺ específicas para CMV de macaco, derivadas de T_{CM} y T_{EM} mediante citometría de flujo para determinar la expresión de CD62L, CCR7, CD28, CD127, granzima B y perforina (línea oscura) y se tiñeron con anticuerpos de control de isotipo (línea discontinua). Los valores mostrados representan la intensidad media de la fluorescencia (MFI). Se muestran los datos de los clones de células T que se transfirieron de manera adoptiva al macaco 02269 y son representativos de los datos de todos los clones de células T usados en los experimentos de transferencia adoptiva en los tres macacos.

Figura 2b. Se examinó la actividad citotóxica de cada par de clones de células T CD8⁺ específicas para CMV derivadas de T_{EM} (triángulos negros) y T_{CM} (cuadrados negros) que se usaron en la transferencia adoptiva en un ensayo de liberación de cromo de 4 horas a una relación del efector y el objetivo de 20:1 mediante el uso de células objetivo autólogas sometidas a pulsos con el péptido IE de CMV en varias concentraciones. Las secuencias de los péptidos IE-1 fueron KKGDIKDRV (02269) y EEHVKLFFK (A99171), la secuencia del péptido IE-2 fue ATTRSLEYK (02258).

Figura 2c. Cultivo in vitro de clones de células T CD8⁺ específicas para CMV. Los clones de células T derivadas de T_{EM} (triángulos negros) y T_{CM} (cuadrados negros) usados para la transferencia adoptiva se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de células de alimentación y-irradiadas e IL-2 (50 U/ml). El crecimiento celular durante 14 días de cultivo se midió mediante el conteo de células viables por exclusión de tripán azul.

Figura 2d. Longitud de los telómeros en los clones de células T específicas para CMV derivadas de los subconjuntos CD62L⁺ y CD62L⁻. La mediana de la longitud de los telómeros de muestras por duplicado se midió mediante flujo-FISH automatizado en linfocitos T de sangre periférica (barras grises), en los clones de células T infundidas (iT_{EM} barras negras, iT_{CM} barras blancas), y en cada uno de los dos clones de células T derivadas de T_{EM} (barras rayadas de la izquierda) y de T_{CM} (barras rayadas de la derecha) adicionales, seleccionados aleatoriamente de cada macaco.

Figura 3. Persistencia y migración de los clones T_E CD8⁺ derivados de T_{EM} y T_{CM} en sangre periférica, médula ósea y nódulos linfáticos después de la transferencia adoptiva.

Figuras 3a-b. Persistencia y migración in vivo de los clones de células T modificadas con ΔCD19 derivadas de T_{EM} (a) y derivadas de T_{CM} (b) en el macaco 02269. Los clones de células T se transfirieron en infusiones separadas administradas por vía intravenosa con 10 semanas de diferencia a una dosis de células de 3 x 10⁸/kg. Las muestras de PBMC se obtuvieron a intervalos de 6-8 semanas después de cada infusión. Las muestras de médula ósea y nódulo linfático se obtuvieron antes de la infusión y catorce días después de cada infusión de células T. Las muestras se tiñeron con anticuerpos anti-CD3, CD8, y CD19 conjugados con fluorocromo, respectivamente. La frecuencia de las células T CD19⁺ transferidas se determinó mediante citometría de flujo con clasificación en células CD3⁺CD8⁺. Los paneles a la izquierda muestran el porcentaje de células T CD8⁺ que expresaron CD19 en sangre, médula ósea y nódulos linfáticos antes y en los intervalos después de la infusión de los clones de células T derivados de T_{EM} (a) y derivados de T_{CM} (b). Los paneles a la derecha muestran las cantidades absolutas de células T CD19⁺CD3⁺CD8⁺ por μl de sangre. Esto se determinó mediante el cálculo de la cantidad absoluta de células T CD3⁺CD8⁺ por μl de sangre en los días indicados (% de células T CD3⁺CD8⁺ en una alícuota de células mononucleares x conteo de células mononucleares por μl de sangre/100). Posteriormente, se derivó la cantidad de células T CD19⁺CD3⁺CD8⁺ (% de células T CD19⁺CD3⁺CD8⁺ x conteo absoluto de CD3⁺CD8⁺ por μl de sangre/100).

Figuras 3c-d. Persistencia y migración in vivo de los clones de células T derivadas de T_{CM} modificadas con ΔCD19 y derivadas de T_{EM} modificadas con CD20, transferidas de manera adoptiva en el macaco 02258. Los clones de células T CD8⁺ específicas para CMV se transfirieron de manera adoptiva en infusiones intravenosas separadas a una dosis de células de 6 x 10⁸/kg. Las alícuotas de sangre, médula ósea y nódulos linfáticos se obtuvieron antes y en los tiempos indicados después de cada infusión de células T y se analizaron mediante citometría de flujo con el uso de anticuerpos específicos para detectar las células T CD19⁺CD8⁺ o CD20⁺CD8⁺ transferidas, respectivamente. Los paneles a la izquierda muestran el porcentaje de células T CD8⁺ que expresaron ΔCD19 (c) o CD20 (d) en sangre, médula ósea y nódulos linfáticos en los intervalos después de cada infusión. Los paneles a la derecha muestran la cantidad absoluta de células T CD3⁺CD8⁺ por μl de sangre que expresaron ΔCD19 (c) o CD20 (d) en los intervalos después de la infusión.

Figura 4. Los clones T_E derivados de T_{CM} experimentan menos apoptosis después de la transferencia adoptiva en comparación con los clones T_E derivados de T_{EM}, y son rescatados de la muerte celular in vitro por la IL-15.

Figura 4a. Expresión de bcl-xl y bcl-2 por los clones de células T CD8⁺ derivados de T_{EM} (barras blancas) y derivados de T_{CM} (barras negras) transferidos de manera adoptiva a los macacos 02269, 02258, y A99171. Las células T se analizaron al final de un ciclo de estimulación de 14 días mediante tinción intracelular con anticuerpos específicos para bcl-x1 y bcl-2. La intensidad media de la fluorescencia de la tinción se muestra en el eje y.

Figura 4b. Apoptosis de los clones T_E CD8⁺ derivados de T_{EM} y derivados de T_{CM} in vivo. Un clon de células T modificadas con ΔCD19, derivado de la fracción T_{EM} CD62L se transfirió de manera adoptiva a una dosis de 6 x 10⁸/kg al macaco A99171, seguido, 5 semanas más tarde, por la infusión de la misma dosis de células de un clon de células T modificadas con ΔCD19, derivado de la fracción T_{CM} CD62L⁺. Las muestras de PBMC se obtuvieron en el día 1 después de la transferencia y la proporción de células T CD8⁺ que expresan ΔCD19 que se unieron a la anexina V y/o se tiñeron de manera positiva para PI se determinó mediante citometría de flujo después de la tinción con anticuerpos anti-CD8 y CD19, y con anexina V y PI. Las PBMC se analizaron directamente y después de 24 horas de cultivo en los medios de CTL. El análisis se realizó después de clasificarlas en células T CD8⁺CD19⁻ (barras blancas) y en células T CD8⁺CD19⁺ (barras negras), respectivamente. Las barras a rayas muestran la proporción de células T en cada uno de los productos celulares antes de la infusión que se unieron a la anexina V o se tiñeron de manera positiva para PI.

Figura 4c. Persistencia y migración de clones T_E derivados de T_{EM} y derivados de T_{CM} en el macaco A99171. Las células de sangre periférica, médula ósea y nódulos linfáticos que se obtuvieron a intervalos después de cada infusión de células T se analizaron mediante citometría de flujo para detectar las células T CD19⁺CD8⁺ transferidas. Las muestras se analizaron después de clasificarlas en células CD3⁺CD8⁺.

Figura 4d. La IL-15 respalda la supervivencia in vitro de los clones T_E CD8⁺ derivados de T_{CM} pero no de los derivados de T_{EM}. Las alícuotas de los clones de células T CD8⁺ específicas para CMV, derivadas de T_{EM} y derivadas de T_{CM}, que se

usaron para la transferencia adoptiva a los macacos 02269, 02258, y A99171 respectivamente, se sembraron en pocillos que contenían medio solo (triángulos blancos) o medio suplementado con IL-2 (16.6 U/ml; 1 ng/ml) (rombos negros) o IL-15 (1 ng/ml) (cuadrados negros), respectivamente. La cantidad de células viables se determinó en los días indicados (hasta los 34 días) mediante el conteo de células usando la exclusión del colorante tripán.

Figura 4e. Los clones derivados de T_{CM} $CD8^+$ expresan mayores niveles de las cadenas del receptor de IL-15 (IL-15R). La expresión de IL-15R α , IL-2R β , e IL-2R γ en las alícuotas de los clones de células T específicas para CMV derivadas de T_{CM} (línea oscura) y derivadas de T_{EM} (línea negra) se midió mediante citometría de flujo en el día 13-14 después de la estimulación. La tinción con el anticuerpo de control de isotipo se muestra mediante la línea discontinua. Se muestran los datos de los clones de células T usados para los experimentos de transferencia adoptiva en el macaco 02269, y son representativos de los datos obtenidos para los clones de células T administrados a los macacos 02258 y A99171, respectivamente.

Figura 5. Las células T_E derivadas de T_{CM} transferidas de manera adoptiva, readquieren marcadores de T_{CM} in vivo y persisten en los nichos de las células de memoria.

Figura 5a. Expresión de CD62L en los clones T_E derivados de T_{EM} (paneles superiores) o derivados de T_{CM} (paneles inferiores) después de la transferencia adoptiva. Las muestras de PBMC se obtuvieron antes y en el día 3 después de la infusión de los clones de células T derivados de T_{CM} y de T_{EM} , y se analizaron mediante citometría de flujo después de la tinción con anticuerpos conjugados con fluorocromo anti-CD3, CD8, CD62L, y ya sea con CD19 o CD20. Las células se clasificaron para identificar las células T $CD3^+CD8^+$ y el porcentaje de células T que expresaron el gen marcador CD19 o CD20 y CD62L se muestra en el cuadrante derecho superior de cada panel.

Figuras 5b-e. Una fracción principal de células T $CD8^+$ que persisten después de la transferencia adoptiva adquieren marcadores fenotípicos de T_{CM} y residen en los nódulos linfáticos. Las alícuotas de PBMC, nódulos linfáticos (LN) y médula ósea (BM) se obtuvieron del macaco 02258 en el día 14 y el día 56 después de la infusión del clon de células T específicas para CMV, derivadas de T_{CM} y modificadas con $\Delta CD19$. La expresión de marcadores fenotípicos de T_{CM} que incluyen CD62L (b), CCR7 (c), CD28 (d) y CD127 (e) en el subconjunto de las células T $CD19^+$ transferidas se determinó mediante citometría de flujo después de clasificarlas en células $CD3^+CD8^+$.

Figura 6. Las células T $CD8^+$ transferidas de manera adoptiva que persisten in vivo muestran propiedades funcionales de células T de memoria.

Figura 6a. Las células T $CD8^+$ transferidas de manera adoptiva que persisten in vivo producen IFN- γ después de la estimulación con antígeno. Las PBMC se obtuvieron antes de la infusión de las células T (Pre) y 21 días después (Post) de la infusión de un clon de células T $CD8^+$ específicas para CMV, derivadas de T_{CM} , modificadas con $\Delta CD19$. Las alícuotas de PBMC se estimularon con medio solo, PMA/ionomicina, o el péptido IE de CMV reconocido por el clon de células T transferidas. La producción de IFN- γ por las células T $CD8^+$ se examinó mediante citometría de flujo de citocinas después de la tinción con anticuerpos anti-CD3, CD8, CD19 e IFN- γ . El análisis se realizó después de clasificarlas en células T $CD3^+CD8^+$. Los datos se muestran para el macaco 02269 y son representativos de un experimento separado en el macaco 02258.

Figura 6b. Las células T transferidas de manera adoptiva que reexpresan CD62L carecen de una citotoxicidad directa pero se diferencian en células citotóxicas después de la estimulación del TCR. Panel izquierdo: Las PBMC obtenidas a los 14-70 días después de la infusión de un clon de células T $CD8^+$ derivadas de T_{CM} , modificadas con $\Delta CD19$, se mezclaron y clasificaron en las fracciones $CD19^+CD62L^-CD8^+$ y $CD19^+CD62L^+CD8^+$ que fueron al menos 80 % puras. Las células clasificadas se examinaron para el reconocimiento de las células objetivo autólogas solas (barras blancas) o sometidas a pulsos con péptido IE de CMV (barras negras) en un ensayo de liberación de cromo de 4 horas a una relación E/T de 5:1. La lisis de las células objetivo por el clon de células T $CD8^+$ modificadas con $\Delta CD19$, derivadas de T_{CM} , cultivadas in vitro, sirvió como un control positivo. Panel derecho: Las alícuotas de las células T $CD62L^- \Delta CD19^+CD8^+$ y $CD62L^+ \Delta CD19^+CD8^+$ clasificadas se estimularon in vitro mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 y CD28, en presencia de células de alimentación y -irradiadas e IL-2 (50 U/ml). Después de 14 días de cultivo, los cultivos se analizaron para el reconocimiento de las células objetivo sometidas a pulsos con el péptido en un ensayo de liberación de cromo de 4 horas (relación E/T de 5:1). Los datos se muestran para el macaco 02258 y son representativos de los observados con el macaco 02269.

Figura 6c. Las células T transferidas de manera adoptiva que readquieren CD62L in vivo muestran una proliferación más rápida que las que permanecen $CD62L^-$. Las alícuotas de las células T clasificadas $\Delta CD19^+CD62L^+CD8^+$ y $\Delta CD19^+CD62L^-CD8^+$ del macaco 02269 se marcaron con CFSE (paneles superiores) y se estimularon in vitro con células B autólogas activadas con CD40L sometidas a pulsos con péptido IE de CMV o con medio solo. Después de 5 días, la dilución de CFSE se evaluó mediante citometría de flujo después de clasificarlas en células $\Delta CD19^+CD3^+CD8^+$. El portal M3 identifica células que han experimentado más de cinco divisiones.

Figura 6d. Las células T transferidas de manera adoptiva pueden dirigirse a la expansión in vivo mediante la infusión de TAPC. Las células T autólogas obtenidas y criopreservadas del macaco A99171 antes de cualquier infusión de células T se descongelaron y expandieron mediante estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, e IL-2. Después de la

expansión, las células T se sometieron a pulsos con péptido IE de CMV reconocido por el clon T_{CM} modificado con ΔCD19, transferido de manera adoptiva. Ocho semanas después de la infusión de células T cuando se estableció un nivel estable de células T CD19⁺ in vivo, se administró una dosis de 1 x 10⁷ T-APC/kg por vía intravenosa. La cantidad absoluta de células T CD3⁺CD8⁺ y células T CD19⁺CD8⁺ /μl de sangre se midió en las muestras obtenidas antes de la administración de T-APC, y en el día +3, +5 y +7 después de la infusión de T-APC. La cantidad de células T CD8⁺ endógenas, específicas para IE, se midió en los mismos puntos de tiempo mediante citometría de flujo de citocinas después de clasificarlas en células CD 19⁺CD3⁺CD8⁺. Los datos muestran el aumento en veces en las cantidades absolutas de células T CD3⁺CD8⁺ (barras blancas), células T CD19⁺CD8⁺ (barras grises), y células T CD8⁺ específicas para IE CD19⁺ (barras negras) en el día +3, +5 y +7 después de la infusión de T-APC.

Figura 6e. Las T-APC sometidas a pulsos con péptido IE se lisaron por las células T CD8⁺ específicas para IE. Las T-APC generadas del macaco A99171 sometidas a pulsos con péptido IE (barras negras) o con medio solo (barras blancas) se marcaron con ⁵¹Cr y se usaron como objetivos para una alicuota del clon de células T CD8⁺ autólogas específicas para IE, que se transfirió de manera adoptiva al macaco A99171.

Descripción detallada de las modalidades preferidas

Las "células T" o "linfocitos T" como se usan en la presente pueden ser de cualquier especie de mamífero, preferentemente de primate, que incluyen monos, perros y seres humanos. En algunas modalidades las células T son alogénicas (de la misma especie pero de diferente donante) que el sujeto receptor; en algunas modalidades las células T son autólogas (el donante y el receptor son los mismos); en algunas modalidades las células T son singénicas (el donante y los receptores son diferentes pero son gemelos idénticos).

Un linfocito T citotóxico (CTL) como se usa en la presente se refiere a un linfocito T que expresa CD8 sobre su superficie (es decir, una célula T CD8⁺). En algunas modalidades tales células son preferentemente células T "de memoria" (células T_M) que tienen experiencia con antígenos.

La célula T "de memoria central" (o "T_{CM}") como se usa en la presente se refiere a un CTL que expresa CD62L en su superficie (es decir, células CD62L⁺CD8⁺).

La célula T "de memoria efectoras" (o "T_{EM}") como se usa en la presente se refiere a un CTL que no expresa CD62L en su superficie (es decir, células CD62L⁻CD8⁺).

"Enriquecido" y "agotado" como se usa en la presente para describir cantidades de tipos celulares en una mezcla se refiere a someter la mezcla de las células a un proceso o etapa que da como resultado un aumento en la cantidad del tipo "enriquecido" y una disminución en la cantidad de las células "agotadas". Por lo tanto, en dependencia de la fuente de la población original de células sometidas al proceso de enriquecimiento, una mezcla o composición puede contener 60, 70, 80, 90, 85, o 99 por ciento o más (en cantidad o conteo) de las células "enriquecidas" y 40, 30, 20, 10, 5 o 1 por ciento o menos (en cantidad o conteo) de las células "agotadas".

La interleucina 15 es bien conocida y se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 6,344,192.

I. Expansión in vitro.

Los linfocitos T pueden obtenerse de acuerdo con técnicas conocidas y enriquecerse o agotarse mediante técnicas conocidas como la unión por afinidad a anticuerpos como la citometría de flujo y/o unión por afinidad. Después de las etapas de enriquecimiento y/o agotamiento, la expansión in vitro de los linfocitos T deseados puede llevarse a cabo de acuerdo con técnicas conocidas (que incluyen pero no se limitan a las descritas en la patente de Estados Unidos núm. 6,040,177 de Riddell y otros), o variaciones de estas que serán evidentes para los expertos en la técnica.

Por ejemplo, la población o subpoblación de células T deseada puede expandirse mediante la adición de una población inicial de linfocitos T a un medio de cultivo in vitro, y después la adición de las células de alimentación al medio de cultivo, tal como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que no están en división, (por ejemplo, de manera que la población de células resultante contenga al menos aproximadamente 5, 10, 20, o 40 o más células de alimentación PBMC por cada linfocito T en la población inicial que va a expandirse); e incubar el cultivo (por ejemplo durante un tiempo suficiente para expandir las cantidades de células T). El orden de adición de las células T y las células de alimentación a los medios de cultivo puede invertirse si se desea. El cultivo puede incubarse típicamente en condiciones de temperatura y similares que sean adecuadas para el cultivo de linfocitos T. Para el cultivo de linfocitos T humanos, por ejemplo, la temperatura será generalmente de al menos aproximadamente 25 grados Celsius, preferentemente al menos aproximadamente 30 grados, con mayor preferencia aproximadamente 37 grados.

Los linfocitos T expandidos típicamente son linfocitos T citotóxicos (CTL) que son específicos para un antígeno presente en un tumor humano o un patógeno.

Las células de alimentación que no están en división pueden comprender células de alimentación PBMC gamma-

irradiadas. En algunas modalidades, las PBMC se irradian con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 3000 a 3600 rads.

- 5 Opcionalmente, el método de expansión puede comprender, además, la etapa de añadir células linfoblastoides transformadas por EBV (LCL) que no están en división como células de alimentación. Las LCL pueden irradiarse con rayos gamma en el intervalo de aproximadamente 6000 a 10,000 rads. Las células de alimentación LCL pueden proporcionarse en cualquier cantidad adecuada, tal como en una relación de las células de alimentación LCL y los linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.
- 10 Opcionalmente, el método de expansión puede comprender, además, la etapa de añadir anticuerpo monoclonal anti-CD3 al medio de cultivo (*por ejemplo*, a una concentración de al menos aproximadamente 0.5 ng/ml). Opcionalmente, el método de expansión puede comprender, además, la etapa de añadir IL-2 y/o IL-15 al medio de cultivo (*por ejemplo*, en donde la concentración de IL-2 es al menos aproximadamente 10 unidades/ml).
- 15 En algunas modalidades puede desearse introducir genes funcionales a las células T que van a usarse en la inmunoterapia de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, el gen o genes introducidos pueden mejorar la eficacia de la terapia mediante la promoción de la viabilidad y/o la función de las células T transferidas; o pueden proporcionar un marcador genético para permitir la selección y/o evaluación de la supervivencia o migración in vivo; o pueden incorporar funciones que mejoran la seguridad de la inmunoterapia, por ejemplo, al hacer a la célula susceptible a una selección negativa in vivo como se describe por Lupton S. D. y otros, Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); y Riddell y otros, Human Gene Therapy 3:319-338 (1992); véanse además las publicaciones de los documentos WO 92/008796 (PCT/US91/08442) y WO 94/028143 (PCT/US94/05601) por Lupton y otros, que describen el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales derivados de la fusión de un marcador de selección positivo dominante con un marcador de selección negativa. Esto puede llevarse a cabo de acuerdo con técnicas conocidas (*véase, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 6,040,177 de Riddell y otros en las columnas 14-17) o variaciones de estas que serán evidentes para los expertos en la técnica basados en la presente descripción.
- 25

Se han desarrollado varias técnicas de infección que utilizan partículas virales infecciosas recombinantes para el suministro de genes. Esto representa un enfoque preferido en la actualidad para la transducción de linfocitos T de la presente invención. Los vectores virales que se han usado de esta manera incluyen vectores virales derivados del virus 40 de simios, adenovirus, virus adenoasociados (AAV) y retrovirus. Por lo tanto, los métodos de transferencia y expresión de genes son numerosos pero esencialmente funcionan para introducir y expresar material genético en células de mamífero. Varias de las técnicas anteriores se han usado para transducir células hematopoyéticas o linfoides, que incluyen transfección con fosfato de calcio, fusión de protoplastos, electroporación, e infección con adenovirus recombinante, virus adenoasociados y vectores retrovirales. Los linfocitos T primarios se han transducido con éxito mediante electroporación y mediante infección retroviral

30

35

Los vectores retrovirales proporcionan un método altamente eficiente para la transferencia de genes a células eucariotas. Además, la integración retroviral tiene lugar de una manera controlada y da como resultado la integración estable de una o pocas copias de la nueva información genética por célula.

40

Se contempla que la sobreexpresión de un factor estimulante (por ejemplo, una linfocina o una citocina) puede ser tóxica para el individuo tratado. Por lo tanto, dentro del alcance de la invención se incluyen segmentos génicos que provocan que las células T de la invención sean susceptibles a la selección negativa in vivo. Por "selección negativa" se entiende que la célula infundida puede eliminarse como resultado de un cambio en la condición in vivo del individuo. El fenotipo de selección negativa puede ser el resultado de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. En la técnica se conocen genes de selección negativa, e incluyen, entre otros, los siguientes: el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple tipo I (HSV-I TK) (Wigler y otros, Cell 11:223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa celular (HPRT), el gen de la adenina fosforribosiltransferasa celular (APRT), citosina desaminasa bacteriana, (Mullen y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:33 (1992)).

45

50

En algunas modalidades puede ser útil incluir en las células T un marcador positivo que permita la selección de las células del fenotipo con selección negativa in vitro. El marcador de selección positiva puede ser un gen que, después de ser introducido en la célula huésped expresa un fenotipo dominante que permite la selección positiva de las células que portan el gen. En la técnica se conocen genes de este tipo, e incluyen, entre otros, el gen de la higromicina-B fosfotransferasa (hph) que confiere resistencia a la higromicina B, el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa (neo o aph) de Tn5 que codifica resistencia al antibiótico G418, el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de la adenosina daminasa (ADA), y el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR).

55

60

Preferentemente, el marcador de selección positiva y el elemento de selección negativa se unen de manera que la pérdida del elemento de selección negativa necesariamente también se acompaña de la pérdida del marcador de selección positiva. Aún con mayor preferencia, los marcadores de selección positiva y negativa se fusionan de manera que la pérdida de uno obligatoriamente conduce a la pérdida del otro. Un ejemplo de un polinucleótido fusionado que produce como producto de expresión un polipéptido que confiere las características de selección tanto positiva como negativa deseadas descritas anteriormente es un gen de fusión de higromicina fosfotransferasa timidina quinasa (HyTK). La expresión de

65

este gen produce un polipéptido que confiere resistencia a la higromicina B para la selección positiva in vitro, y sensibilidad al ganciclovir para la selección negativa in vivo. Véase Lupton S. D., y otros, Mol. and Cell. Biology 11:3374-3378, 1991. Además, en modalidades preferidas, los polinucleótidos de la invención que codifican los receptores quiméricos están en vectores retrovirales que contienen el gen fusionado, particularmente los que confieren resistencia a la higromicina B para la selección positiva in vitro, y sensibilidad al ganciclovir para la selección negativa in vivo, por ejemplo el vector retroviral HyTK descrito en Lupton, S. D. y otros (1991), más arriba. Véanse además las publicaciones de los documentos WO 92/008796 (PCT/US91/08442) y WO 94/028143 (PCT/US94/05601), por S. D. Lupton, que describen el uso de genes de fusión seleccionables bifuncionales derivados de la fusión de marcadores de selección positiva dominantes con marcadores de selección negativa.

Los marcadores de selección positiva preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en hph, neo, y gpt, y los marcadores de selección negativa preferidos se derivan de genes seleccionados del grupo que consiste en citosina desaminasa, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT y gpt. Los marcadores preferidos especialmente son genes de fusión seleccionables bifuncionales en donde el marcador de selección positiva se deriva de hph o neo, y el marcador de selección negativa se deriva de citosina desaminasa o un gen de TK.

Pueden emplearse una variedad de métodos para transducir linfocitos T, como se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, las transducciones retrovirales pueden llevarse a cabo de la siguiente manera: en el día 1 después de la estimulación con el uso de REM como se describe en la presente, proporcionar IL-2 a 20-30 unidades/ml a las células; en el día 3, reemplazar la mitad del medio con sobrenadante retroviral preparado de acuerdo con métodos estándar y después suplementar los cultivos con Polibrene a 5 ug/ml e IL-2 a 20-30 unidades/ml; en el día 4, lavar las células y colocarlas en medio de cultivo fresco suplementado con IL-2 a 20-30 unidades/ml; en el día 5, repetir la exposición al retrovirus; en el día 6, colocar las células en medio selectivo (que contiene, por ejemplo, un antibiótico correspondiente a un gen de resistencia a antibióticos proporcionado en el vector retroviral) suplementado con IL-2 a 30 unidades/ml; en el día 13, separar las células viables de las células muertas mediante una separación por gradiente de densidad de Ficol Hypaque y después subclonar las células viables.

II. Composiciones y métodos

Los sujetos que pueden tratarse mediante la presente invención son, en general, sujetos humanos y otros primates, como monos y simios para propósitos de medicina veterinaria. Los sujetos pueden ser masculinos o femeninos y pueden tener cualquier edad adecuada, que incluye sujetos bebés, juveniles, adolescentes, adultos y geriátricos.

Los sujetos que pueden tratarse incluyen sujetos que padecen cáncer, que incluyen pero sin limitarse a cáncer de colon, pulmón, hígado, mama, próstata, ovario, piel (que incluye melanoma), hueso y cerebro, etcétera. En algunas modalidades se conocen los antígenos asociados a tumores, como melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de colon, leucemia, mieloma, cáncer de próstata, etcétera (en estas modalidades las células T de memoria pueden aislarse o modificarse genéticamente mediante la introducción de los genes del receptor de células T). En otras modalidades el direccionamiento a las proteínas asociadas a tumores puede lograrse con células T modificadas genéticamente que expresan un inmunorreceptor modificado genéticamente. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a linfoma de células B, cáncer de mama, cáncer de próstata y leucemia.

Los sujetos que pueden tratarse incluyen, además, sujetos que padecen, o están en riesgo de desarrollar, una enfermedad infecciosa, que incluye pero sin limitarse a infecciones virales, retrovirales, bacterianas y protozoarias, etcétera.

Los sujetos que pueden tratarse incluyen pacientes inmunodeficientes que padecen de una infección viral, que incluye pero sin limitarse a infecciones por citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), adenovirus, poliomavirus BK en pacientes con trasplantes, etcétera.

Las células preparadas como se describió anteriormente pueden utilizarse en métodos y composiciones para la inmunoterapia adoptiva de acuerdo con técnicas conocidas, o variaciones de estas que serán evidentes para los expertos en la técnica basados en la presente descripción. Véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2003/0170238 de Gruenberg y otros; véase además la patente de Estados Unidos núm. 4,690,915 de Rosenberg.

En algunas modalidades, las células se formulan en primer lugar al cosecharlas de su medio de cultivo, y después lavar y concentrar las células en un medio y un sistema contenedor adecuado para una administración (un portador "farmacéuticamente aceptable") en una cantidad eficaz para el tratamiento. El medio de infusión adecuado puede ser cualquier formulación de medio isotónico, típicamente solución salina normal, Normosol R (Abbott) o Plasma-Lyte A (Baxter), pero también puede utilizarse dextrosa al 5 % en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión puede suplementarse con albumen de suero humano.

Una cantidad de células en la composición, que sea eficaz para el tratamiento, es al menos 10^9 , típicamente mayor que 10^9 , al menos 10^{10} células, y generalmente más de 10^{10} . El número de células dependerá del uso final para el que está destinada la composición así como el tipo de células incluidas en esta. Por ejemplo, si se desean células que son específicas para un antígeno en particular, entonces la población contendrá más del 70 %, generalmente más del 80 %, de células específicas.

85 % y 90-95 % de tales células. Para los usos proporcionados en la presente, las células están generalmente en un volumen de un litro o menos, puede ser 500 ml o menos, incluso 250 ml o 100 ml o menos. Por tanto la densidad de las células deseadas es típicamente mayor que 10^6 células/ml y generalmente es mayor que 10^7 células/ml, generalmente 10^8 células/ml o mayor. El número clínicamente relevante de células inmunitarias puede distribuirse en múltiples infusiones que acumulativamente igualan o exceden 10^9 , 10^{10} o 10^{11} células.

En algunas modalidades, los linfocitos de la invención pueden usarse para conferir inmunidad a los individuos. Por "inmunidad" se entiende una disminución de uno o más síntomas físicos asociados con una respuesta a una infección por un patógeno, o a un tumor, al que se dirige la respuesta de linfocitos. La cantidad de células administradas está usualmente en el intervalo presente en individuos normales con inmunidad al patógeno. Por lo tanto, las células usualmente se administran mediante infusión, donde cada infusión está en un intervalo de al menos 10^6 a 10^{10} células/m², preferentemente en el intervalo de al menos 10^7 a 10^9 células/m². Los clones pueden administrarse mediante una sola infusión, o mediante múltiples infusiones en un intervalo de tiempo. Sin embargo, dado que se espera que la capacidad de respuesta varíe en diferentes individuos, el tipo y la cantidad de células infundidas, así como la cantidad de infusiones y el intervalo de tiempo en el que se administran múltiples infusiones se determinan por el médico especialista, y pueden determinarse mediante el examen de rutina. La generación de niveles suficientes de linfocitos T (que incluyen linfocitos T citotóxicos y/o linfocitos T cooperadores) puede lograrse fácilmente mediante el uso del método de expansión rápido de la presente invención, como se ejemplifica en la presente. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6,040,177 de Riddell y otros en la columna 17.

La presente invención se ilustra adicionalmente en los ejemplos expuestos más adelante.

Parte experimental

En el huésped normal, la memoria de las células T persiste durante la vida lo que indica la capacidad de autorrenovación además de diferenciación²³. Esta calidad de memoria de las células T se ha sugerido que reside en el subconjunto T_{CM} CD62L⁺, aunque en ratones se ha identificado un subconjunto único de células T que se autorrenuevan y diferencian^{18, 23, 24}. Buscamos determinar si los clones T_E diferenciados in vitro a partir de los subconjuntos T_{CM} o T_{EM} podrían diferir intrínsecamente en su potencial de persistir después de la transferencia adoptiva. Aquí, mostramos en un modelo de primate no humano relevante para la traducción a humanos, que los clones T_E con especificidad antigénica derivados de los precursores T_{CM} pero no de T_{EM} pueden persistir, migrar a los nódulos linfáticos y la médula ósea, readquirir propiedades fenotípicas de T_{CM} y T_{EM}, y responder a un reto con antígenos.

Métodos

Animales y diseño experimental. Los macacos adultos (*Macaca nemestrina*) se alojaron en el Centro de Investigaciones de Primates de la Universidad de Washington Regional, en condiciones aprobadas por la Asociación Americana para la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio. El comité institucional para el cuidado y uso de animales aprobó los protocolos experimentales.

Se seleccionaron macacos saludables para este estudio si tenían evidencia de infección anterior por CMV según se determinó por una respuesta linfoproliferativa positiva a un antígeno de CMV y una respuesta de células T CD8⁺ a los péptidos IE-1 o IE-2 del CMV²⁵. Los clones de células T CD8⁺ específicas para CMV se aislaron a partir de las células T CD62L⁺CD8⁺ y CD62L⁺CD8⁺ obtenidas mediante clasificación celular de las PBMC de cada macaco, se modificaron mediante transferencia de genes retrovirales, se expandieron in vitro y se infundieron por vía intravenosa a dosis de células de 3-6 x 10⁸/kg. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción a intervalos después de cada infusión, y la médula ósea de la cresta ilíaca posterior y un nódulo linfático de la región inguinal se obtuvieron bajo anestesia.

Laboratorios clínicos acreditados realizaron el análisis químico de CBC y el suero de la sangre obtenida antes y a intervalos después de cada infusión de células T. Los macacos se siguieron durante al menos 7 semanas después de cada infusión de células T.

Citometría de flujo de citocinas para la detección de células T CD8⁺ específicas para CMV. Las PBMC se aislaron de sangre periférica mediante separación por gradiente de Ficoll-Hypaque. Se usó citometría de flujo de múltiples parámetros para detectar las células T CD8⁺ en las PBMC que expresaban IFN-γ intracelular después de la estimulación con mezclas de péptidos sintéticos de 15 mer con una superposición de 11 aminoácidos (aa) que abarca la secuencia de 558 aa de la proteína IE1 del rhCMV (número de acceso del GenBank: M93360), o con un péptido IE-2 proporcionado amablemente por el Dr. L. Picker (Universidad de Ciencias de la Salud de Oregón)²⁵. Los péptidos que comprendieron el panel se sintetizaron mediante el uso de química estándar de FMOC (NMI) y se dispusieron en una rejilla analítica compuesta de 24 mezclas, cada una de las cuales contenía 11-12 péptidos. Las alícuotas de PBMC se estimularon durante 6 horas a 37 °C con las mezclas de péptidos (5 µg/ml) o medio solo en presencia de los anticuerpos monoclonales anti-CD28 y anti-CD49d a 1 µg/ml. La estimulación con PMA (10 ng/ml; Sigma) e ionomicina (1 µg/ml; Sigma) se realizó como un control positivo. Después de dos horas, se añadió brefeldina A (10 µg/ml; Sigma). Las células se tiñeron primero con anti-CD8β marcado con ficoeritrina (PE) (Immunotech Coulter) y anti-CD4 marcado con la proteína clorofila-peridina (PerCP)-Cy5.5, después se permeabilizaron mediante el uso de la solución de permeabilización Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences (BD)),

y se tiñeron con un anticuerpo anti-IFN- γ marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD). Todos los análisis se realizaron en un FACSCalibur y los datos se analizaron mediante el uso del programa informático CellQuest (BD). Los péptidos inmunogénicos de CMV se identificaron mediante las respuestas de células T CD8⁺ a los péptidos que se intersecan en la rejilla y los ensayos se repitieron con cada péptido individual y los péptidos de 9 mer derivados para confirmar y mapear la especificidad.

Para determinar si las células T CD8⁺ para los péptidos IE de CMV estaban presentes en los subconjuntos T_{CM} y T_{EM}, las PBMC se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD8 y anti-CD62L conjugados con fluorocromo, y las células T CD62L⁺CD8⁺ y las células T CD62L⁻CD8⁺ se clasificaron mediante el uso de un clasificador de células Vantage BD. Las células clasificadas se analizaron mediante citometría de flujo de citocinas después de la estimulación con células B autólogas que se activaron mediante el cultivo en células 3T3 NIH modificadas para expresar CD40L humano, y después se sometieron a pulsos con los péptidos IE individuales o con medio solo. Las células B activadas con CD40L se cocultivaron con las células T CD62L⁺CD8⁺ y CD62L⁻CD8⁺ purificadas durante 6 horas antes de la adición de brefeldina A por unas 4 horas adicionales, seguido de la permeabilización y tinción para IFN- γ intracelular.

Vectores retrovirales. Un gen truncado de CD19 de macaco que codifica para el dominio extracelular y transmembrana (Δ CD19) y cuatro aa de la cola citoplásmica para anular la señalización, y el gen de CD20 de longitud completa se amplificaron mediante RT-PCR a partir del ADNc generado de las PBMC de macaco y se clonaron en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Los genes de Δ CD19 y CD20 se subclonaron en el plásmido retroviral pMP71GFP_{pre} (W. Uckert, Max-Delbruck-Center, Berlín, Alemania) después de retirar el gen de GFP⁴³. El sobrenadante retroviral se produjo en la línea celular de empaquetamiento Phoenix Galv (G. Nolan, Universidad de Stanford, Estados Unidos) después de la transfección con el uso de Eugene G de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics).

Cultivo y modificación genética de los clones de células T CD8⁺ específicas para CMV para la transferencia adoptiva. Las fracciones de células T CD62L⁺CD8⁺ y CD62L⁻CD8⁺ se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con HEPES 25 mM, suero AB humano al 10 %, 2-mercaptoetanol 25 μ M, y L-glutamina 4 mM (medio para las células T), y se cocultivaron con monocitos autólogos sometidos a pulsos con péptidos IE-1 o IE-2 del CMV (1 μ g/ml). La IL-2 (10 U/ml; Chiron Corporation) se añadió en el día 3 del cultivo. En el día 7, se generaron clones de células T mediante el sembrado de 0.3 células T por pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos con 1×10^5 PBMC autólogas y irradiadas sometidas a pulsos con péptidos IE-1 o IE-2 del CMV (0.5 μ g/ml) y 1×10^4 células B linfoblastoides (LCL) y irradiadas como células de alimentación en presencia de IL-2 a 50 U/ml.

Después de 14 días, una alícuota de los pocillos de clonación con crecimiento visible se analizó en un ensayo de liberación de cromo para el reconocimiento de células objetivo autólogas ya sea sometidas a pulsos con péptido de CMV o con medio solo. Los clones de células T que solo lisaron las células objetivo sometidas a pulsos con péptido se expandieron mediante estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de PBMC humanas y irradiadas y LCL transformadas con EBV, e IL-2 (50 U/ml) como se ha descrito^{44, 45}. En el día 2 después de la estimulación, las células se sedimentaron, resuspendieron en sobrenadante retroviral de Δ CD19 o CD20 con IL-2 (50 U/ml) y Polibrene (5 μ g/ml), se centrifugaron a 1000 g durante 1 hora a 32 °C, y se incubaron durante la noche. Las células se lavaron después y se cultivaron en medio de CTL que contenía IL-2. En el día 6 después de la transducción retroviral, las células T que expresaron el transgén Δ CD19 o CD20 se seleccionaron con perlas inmunomagnéticas. Brevemente, las células T transducidas se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-CD19 (Immunotech Coulter) o anti-CD20 (BD), se lavaron, incubaron con perlas magnéticas acopladas con anticuerpo de rata anti-IgG de ratón (Miltenyi Biotec), y se seleccionaron mediante el uso del dispositivo MidiMACS. Las células seleccionadas se cultivaron después durante unos 6 días adicionales y se criopreservaron en alícuotas que pueden descongelarse posteriormente para los experimentos de transferencia adoptiva. La clonalidad de los clones de células T infundidas se confirmó mediante análisis de las redistribuciones del gen de V β de TCR.

Para evaluar la viabilidad celular in vitro, las alícuotas de los clones de células T al final del ciclo de estimulación de 14 días e inmediatamente antes de la transferencia adoptiva se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos a 2-4. 10^6 células/pocillo en medio para células T solo, medio con IL-2 (1 ng/ml o 16 U/ml; Chiron), IL-15 (1 ng/ml; R&D Systems), o IL-7 (10 ng/ml; R&D).

La viabilidad de las células T se evaluó cada 3-4 días mediante exclusión del colorante tripán azul. En algunos experimentos, las alícuotas de los clones de células T se cultivaron con medio que contenía IL19 21 (30 ng/ml) (R&D) o se cocultivaron con PBMC autólogas y células dendríticas maduras derivadas de monocitos⁴⁶.

Generación de T-APC. Para generar T-APC, se expandieron las alícuotas de células T policlonales autólogas mediante estimulación con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 e IL-2 (50 U/ml). Al final de un ciclo de estimulación de 14 días, las células T se cosecharon, se sometieron a pulsos durante 30 min con 1 μ g/ml del péptido IE de CMV cognado, se lavaron dos veces en medio, se suspendieron en solución salina normal y se administraron al animal mediante infusión intravenosa a una dosis de células de 1×10^7 /kg. Una alícuota de las células T autólogas antes y después del pulso con el péptido IE de CMV se marcaron con ⁵¹Cr y se analizaron como objetivos para el clon de células T específicas para CMV.

Ensayos de citotoxicidad. Las respuestas citotóxicas de las células T específicas para CMV se examinaron como se ha

descrito^{44,41,47}. Brevemente, las células T autólogas marcadas con ⁵¹Cr se sometieron a pulsos durante la noche con antígeno peptídico a diversas concentraciones o medio solo y se usaron en un ensayo de liberación de cromo para el reconocimiento por los clones de células T CD8⁺.

5 Citometría de flujo. Las PBMC y los clones de células T se analizaron mediante citometría de flujo después de la tinción con anticuerpos monoclonales anti-CD3 (SP34), CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD62L, CCR7, CD122 (IL2-R β), CD132 (IL2-R γ) (BD), CD19, CD8 β , CD45RO, y CD127 (Immunotech Coulter) e IL15R α conjugados con fluorocromo (R&D). Para la tinción intracelular, las células se suspendieron en solución de permeabilización CYTOFIX/CYTOPERM™ (BD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se tiñeron con anticuerpos monoclonales para la granzima B (BD), perforina (Kamiya Biomedical), bcl-2 (BD), y bcl-xl (Southern Biotech). Los anticuerpos monoclonales irrelevantes de control de isotipo coincidente sirvieron como controles (BD). En algunos experimentos, las muestras de PBMC se marcaron con anti-CD8-FITC y anti-CD19 alofococianina (APC) y se tiñeron con anexina V-PE y PI de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los análisis se realizaron en un FACSCalibur y los datos se analizaron mediante el uso del programa informático CellQuest (BD).

15 Marcaje con CFSE de las células T. Las células T CD19⁺CD62L⁺CD8⁺ y CD19⁺CD62L⁻CD8⁺ se clasificaron en flujo de las muestras de PBMC mezcladas, obtenidas después de la transferencia adoptiva y se marcaron con CFSE 0.625 μ M (Molecular Probes) en PBS durante 10 minutos a 37 °C en agitación constante, seguido por bloqueo con medio FCS al 20 %. Las células T marcadas con CFSE se sembraron a 1×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con células B autólogas activadas con CD40L (2.5×10^4 células/pocillo) sometidas a pulsos con péptido IE de CMV a 200 ng/ml. La dilución de CFSE se analizó mediante citometría de flujo después de cinco días.

25 PCR con sondas fluorescentes. Las amplificaciones y los análisis por PCR se realizaron mediante el uso de un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (Perkin-Elmer Applied Biosystems)^{45, 48}. El ADN (0.3-1 μ g) se amplificó por duplicado mediante el uso de cebadores de PCR y sondas TaqMan (Synthegen) diseñadas para detectar una única secuencia MP71CD20_{pre} mediante el uso de una sonda etiquetada con fluorescencia que abarca la unión del gen de CD20 y el vector retroviral pMP71_{pre}.

30 Los patrones consistieron de ADN derivado de las células T CD20₊ infundidas. Las alícuotas de las PBMC de preinfusión sirvieron como control negativo.

35 Análisis de la longitud de los telómeros. La longitud promedio de las repeticiones de los telómeros en linfocitos individuales se midió mediante flujo-FISH automatizado como se ha descrito^{49, 50}. Las células, que se congelaron previamente en DMSO 10 % (v/v) suero humano 20 % (v/v), se descongelaron y procesaron en placas de microtitulación para el flujo-FISH automatizado. Las células se hibridaron con o sin una sonda de PNA (CCCTAA)₃, específica de telómeros, conjugada con FITC, a 0.3 μ g/ml, se lavaron y contratiñeron con LDS 751 a 0.01 μ g/ml (Exciton Chemical). Para convertir la fluorescencia medida en las células de la muestra, hibridadas con la sonda de PNA para telómeros marcada con FITC en kilobases (kb) de repeticiones de los telómeros, los timocitos de bovino fijos con una longitud conocida de los telómeros como control interno se procesaron simultáneamente con cada muestra⁵⁰. Las perlas fluorescentes marcadas con FITC se usaron para corregir los cambios diarios en la linealidad del citómetro de flujo y las fluctuaciones en la intensidad y el alineamiento del láser. El registro de los datos de citometría de flujo se realizó en un aparato FACSCalibur™ y el análisis de los datos se realizó mediante el uso de un sistema de análisis de datos CellQuestPro™ (BD).

45 Resultados

Caracterización de los clones de células T CD8⁺ específicos de citomegalovirus (CMV), derivados de los subconjuntos T_{CM} CD62L⁺ y T_{EM} CD62L⁻. En este estudio se usaron *Macaca nemestrina* inmunocompetentes con infección latente de CMV. Para identificar las células T CD8⁺ específicas para CMV, se estimularon alícuotas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de cuatro macacos con los péptidos inmediatos tempranos (IE)-1 o IE-2 de CMV de Rhesus y se analizó la producción de interferón-gamma (IFN- γ) mediante citometría de flujo²⁵. Después de la identificación de un epítipo inmunogénico de CMV para cada macaco, se evaluó la presencia de células T CD8⁺ específicas en las fracciones de células T CD62L⁺ y CD62L⁻, purificadas a partir de las PBMC y que contienen T_{CM} y T_{EM} respectivamente. La estimulación de células T CD62L⁺ y CD62L⁻ con los péptidos de CMV identificaron células T CD8⁺ que produjeron IFN- γ en ambos subconjuntos (Figura 1a). La mayoría de las células T CD62L⁺ fueron positivas para CCR7 y CD28, y expresaron niveles bajos o nulos de granzima B. Las células T CD62L⁻ fueron negativas mayoritariamente para CD28 y CCR7, y positivas para la granzima B (no mostrado).

Después se generaron clones de células T CD8⁺ específicas para CMV para la transferencia adoptiva de las células CD62L⁺CD8⁺ (T_{CM}) y CD62L⁻CD8⁺ (T_{EM}) purificadas de tres macacos (Figura 1b). Los clones de células T CD8⁺, citolíticas, específicas para CMV, se obtuvieron de ambos subconjuntos T_M en todos los macacos. La eficiencia de clonación fue 13.6-23.2 % para los cultivos iniciados de T_{CM}, y 0.4-10.4 % para los cultivos iniciados de T_{EM}. Los clones de células T individuales se transdujeron con un vector retroviral que codifica ya sea una molécula truncada de CD19 de la superficie celular (Δ CD19) o una molécula CD20 de longitud completa para permitir el seguimiento de las células in vivo, y las células T transducidas se seleccionaron con perlas inmunomagnéticas (Figuras 1c, d). Un par de clones derivados de T_{CM} y T_{EM} se seleccionó aleatoriamente de cada uno de los tres macacos, y se expandió en cultivo a $> 5 \times 10^9$ células durante una duración total del cultivo de 49 días antes de la transferencia adoptiva. Independiente de su

derivación de células CD62L⁺ o CD62L⁻, todos los clones de células T específicas para CMV se diferenciaron a T_E y fueron negativas para CD62L, CCR7, CD28, y CD127, y positivas para la granzima B y perforina (Figura 2a). Los clones de células T de cada par reconocieron el mismo péptido de CMV, tuvieron una avidez comparable, mostraron un crecimiento casi idéntico después de la estimulación del receptor de células T (TCR), y tuvieron similares longitudes de los telómeros (Figuras 2b-d).

Persistencia in vivo de los clones T_E CD8⁺ derivados de T_{CM} CD62L⁺ o T_{EM} CD62L⁻. Las células T autólogas modificadas genéticamente se administraron por vía intravenosa y se midió su frecuencia en la sangre, nódulo linfático y médula ósea a intervalos después de la infusión. Un clon de células T modificadas con Δ CD19, derivado de T_{EM} se transfirió al macaco 02269 a una dosis de 3×10^8 células T/kg, que es aproximadamente el 5-10 % del conjunto de linfocitos totales de macacos²⁶. Las células T CD19⁺CD8⁺ se detectaron fácilmente en la sangre un día después de la infusión a una frecuencia de 1.2 % de las células CD8⁺ o 10 células/ μ l de sangre. Las células T CD19⁺ en la sangre tuvieron un máximo en 3.7 % de las células T CD8⁺ (40 células/ μ l) en el día tres después de la infusión. Sin embargo, las células T no se detectaron en la sangre obtenida en el día cinco o múltiples veces hasta los cuarenta y dos días después de la infusión, y no estaban presentes en las muestras de médula ósea o nódulo linfático obtenidas catorce días después de la infusión (Figura 3a). La misma dosis de un clon de células T específicas para CMV, modificadas con Δ CD19, derivadas del subconjunto T_{CM} se transfirió a este macaco. En el día uno después de la infusión, la frecuencia de las células T CD19⁺CD8⁺ en la sangre fue de 2.2 % de las células T CD8⁺ (10 células/ μ l). A diferencia del clon derivado de T_{EM}, las células derivadas de T_{CM} persistieron en la sangre por más de cincuenta y seis días después de la infusión a 0.2 % de las células T CD8⁺ (3-6 células/ μ l), y comprendieron el 1.2 % y 0.6 % de las células T CD8⁺ en las muestras de médula ósea y nódulo linfático respectivamente, obtenidas catorce días después de la infusión (Figura 3b). En un segundo macaco, se infundió un clon derivado de T_{CM}, modificadas con Δ CD19 primero a una mayor dosis de células de 6×10^8 /kg. Con esta dosis, las células transferidas se detectaron en la sangre a una frecuencia de 26.3 % de las células T CD8⁺ (228 células/ μ l) en el día uno y 46.3 % de las células T CD8⁺ (734 células/ μ l) en el día tres. El clon derivado de T_{CM} transferido estuvo presente en la médula ósea y el nódulo linfático obtenidos en el día catorce a 4.7 % y 0.7 % de las células T CD8⁺, respectivamente (Figura 3c). La frecuencia de las células transferidas en la sangre declinó gradualmente durante los veintiocho días a un nivel estable de 7-10 células/ μ l que persistieron durante más de once meses después de la infusión (Figura 3c). Se administró la misma dosis de un clon derivado de T_{EM} transducido para expresar CD20 para permitir el seguimiento de las células y su reconocimiento respecto de las células T modificadas con Δ CD19, transferidas previamente. La frecuencia de células T CD20⁺CD8⁺ en la sangre un día después de la infusión fue de 16.3 % de las células T CD8⁺ (103 células/ μ l), pero las células transferidas desaparecieron de la sangre hacia el día cinco y no se detectaron en la médula ósea y el nódulo linfático obtenidos catorce días después de la infusión (Figura 3d). La desaparición de las células T modificadas con CD20 se confirmó mediante PCR para las secuencias del vector en ADN aislado de las células mononucleares de sangre periférica, médula ósea y nódulo linfático obtenidas en el día 14 (datos no mostrados).

Las células T_E CD8⁺ derivadas de T_{EM} experimentan una rápida apoptosis después de la transferencia adoptiva y responden poco a la IL-15. La no persistencia de los clones de T_E derivados de T_{EM} en sangre, médula o nódulos linfáticos después de la transferencia adoptiva puede deberse a la muerte celular in vivo y/o migración a otros sitios tisulares. Los clones derivados de T_{EM} expresaron menores niveles de las proteínas antiapoptóticas bclxl y bcl-2 que los clones derivados de T_{CM}, lo que sugiere que pueden ser más susceptibles a la apoptosis (Figura 4a). Por lo tanto, se infundió un clon de células T derivadas de T_{EM}, modificadas con Δ CD19, al tercer macaco y se midió la proporción de células transferidas en las PBMC que fueron positivas para yoduro de propidio (PI) y unión a anexina V²⁷. Aproximadamente el 40 % de las células T CD19⁺CD8⁺ en las PBMC fueron positivas a PI y/o anexina V cuando se analizaron directamente en el día uno, y 45 % fueron positivas después de cultivar las PBMC durante 24 horas (Figura 4b).

Consistente con los animales anteriores, el clon derivado de T_{EM} se detectó en la sangre solo durante tres días, y no estuvo presente en las muestras de médula ósea o nódulo linfático del día catorce (Figura 4c). Después se infundió un clon de células T derivadas de T_{CM}, modificadas con Δ CD19, en el mismo animal y se analizó la proporción de células apoptóticas. Menos del 20 % de las células T_{CM} transferidas fueron positivas a PI y/o anexina V en las PBMC analizadas directamente, y esta fracción disminuyó a 12 % después de 24 horas de cultivo (Figura 4b). El clon derivado de T_{CM} migró a la médula ósea y nódulos linfáticos (Figura 4c), y persistió en la sangre por más de setenta y siete días como se observó previamente (datos no mostrados). Consideramos que la supervivencia selectiva de las células T derivadas de T_{CM} in vivo podría deberse a la capacidad de respuesta a las citocinas homeostáticas como IL-15 que mantienen las células T de memoria CD8⁺ endógenas²⁸⁻³⁰, y las alícuotas cultivadas de los clones derivados de T_{CM} y T_{EM} en medios que contienen dosis bajas de IL-15, IL-2 o IL-7. Ambos clones T_{EE} derivados de T_{EM} y T_{CM} carecieron de la expresión de IL-7R α (Figura 2a) y murieron rápidamente in vitro cuando se cultivaron en IL-7 o en medio solo (Figura 4d). El cultivo en IL-15 o IL-2 tampoco mejoró la viabilidad de los clones derivados de T_{EM} (Figura 4d). Por el contrario, los clones derivados de T_{CM} fueron rescatados de la muerte celular por más de 30 días en IL-15 y mostraron mejor supervivencia en IL-2 (Figura 4d). La capacidad de respuesta de los clones derivados de T_{CM} a la IL-15 se correlacionó con mayores niveles de IL-15R α , IL-2R β , e IL-2R γ de la superficie celular en comparación con los clones derivados de T_{EM} (Figura 4e).

Los clones T_E CD8⁺ transferidos de manera adoptiva, derivados de T_{CM} adquieren un fenotipo de memoria in vivo. La migración de los clones T_E CD8⁺ derivados de T_{CM} a los nódulos linfáticos sugirió que CD62L podría reexpresarse en las células transferidas in vivo. CD62L no se detectó en los clones de células T en el momento de la transferencia adoptiva (Figura 2a), o después del cultivo en ausencia de estimulación con antígeno con citocinas (IL-2, IL-7, IL-15, IL-

21), PBMC autólogas, o células dendríticas derivadas de monocitos (datos no mostrados). Sin embargo, en los tres macacos, se observaron células CD19⁺CD62L⁺CD8⁺ en la sangre tan temprano como a los tres días después de la infusión de los clones derivados de T_{CM} y se detectaron en las muestras de sangre, médula ósea y nódulo linfático obtenidas en el día 14 (Figura 5a, b). La proporción de células T transferidas que fueron CD62L⁺ en el nódulo linfático fue mayor que en la sangre o médula (Figura 5b).

CD62L no se expresó durante el corto periodo en que el clon derivado de T_{EM} persistió en la sangre en cualquiera de los tres macacos (Figura 5a). Después se examinó si las células T que persistieron in vivo después de la transferencia adoptiva adquirieron otros marcadores fenotípicos de células T de memoria que no estaban presente en las T_E infundidas. Catorce días después de la transferencia de células, un subconjunto de las células T CD19⁺CD8⁺ en sangre y nódulo linfático expresaron CCR7, CD28, y CD127 (Figuras 5c-e). Este análisis se repitió en las muestras de sangre, médula ósea y nódulo linfático obtenidas dos meses después de la infusión del clon derivado de T_{CM} en el macaco 02258. En este momento más tarde, las células T CD19⁺ infundidas comprendieron 1.4 % de las células T CD8⁺ en el nódulo linfático y estas células T fueron uniformemente positivas para marcadores de T_{CM} que incluyen CD62L, CCR7, CD28 y CD127 (Figuras 5b-e). Las células T transferidas estaban presentes en niveles menores en la sangre y la médula ósea, y contenían ambas fracciones CD62L⁺ y CD62L⁻. Las células T CD19⁺ transferidas que persistieron a largo plazo en la sangre y expresaron CD62L, también expresaron CCR7, CD28 y CD127 (no mostrado). Por lo tanto, a pesar de la diferenciación a T_E durante la expansión de una sola célula T_{CM} a más de 5 x 10⁹ células, una fracción significativa de los clones de células T transferidas fueron capaces de persistir a largo plazo, competir con las células T endógenas por los nichos anatómicos de T_{CM}, y reexpresar marcadores fenotípicos de T_{CM}.

Las células T de memoria establecidas por transferencia adoptiva muestran propiedades funcionales de ambos T_{CM} y T_{EM}. Un objetivo de la inmunoterapia con células T es establecer una mezcla estable de células T de memoria que puedan responder a un antígeno mediante la producción de citocinas y la diferenciación a células efectoras citolíticas. Las células derivadas de T_{CM} CD19⁺ transferidas que persistieron en la sangre produjeron IFN- γ después de la estimulación con péptido y su frecuencia fue comparable con las células T CD8⁺ endógenas, específicas para CMV, CD19⁻ (Figura 6a). La función citolítica de estas células T se examinó mediante clasificación de las células T de la sangre en las fracciones CD19⁺CD62L⁺CD8⁺ y CD19⁺CD62L⁻CD8⁺. Para estos experimentos, fue necesario mezclar las muestras de PBMC de múltiples puntos de tiempo para obtener células suficientes para los ensayos. Las células T CD19⁺CD62L⁻ demostraron actividad citolítica casi equivalente a la del clon de células T y expresaron granzima B, mientras que las células T CD19⁺CD62L⁺ no tuvieron una actividad citolítica directa y tuvieron baja expresión de granzima B (Figura 6b). La estimulación in vitro de las células T CD19⁺CD62L⁺ con los anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 generó células T_E con actividad citolítica, lo que demuestra que estas células pueden reinducirse para diferenciarse a T_E citolíticas (Figura 6b). Además, las fracciones de células T CD19⁺CD62L⁺ y CD19⁺CD62L⁻ clasificadas se marcaron con CFSE y se monitoreó la proliferación cinco días después de la estimulación con antígenos in vitro. El setenta y cuatro por ciento de las células CD62L⁺ experimentaron 5 o más divisiones celulares, pero solo el 13 % de las células CD62L⁻ experimentaron 5 o más divisiones (Figura 6c). Por lo tanto, la transferencia adoptiva de un clon T_E derivado de la mezcla de T_{CM} estableció distintas poblaciones de células in vivo con las propiedades funcionales de T_{CM} y T_{EM}.

Previamente habíamos demostrado en estudios en seres humanos que la infusión de células T que expresan un antígeno foráneo puede cebar y potenciar las respuestas de células T de memoria endógenas con especificidad antigénica³¹. Por lo tanto, para determinar si las T_M establecidas mediante transferencia adoptiva pueden responder a la estimulación con antígenos in vivo, se infundió una pequeña dosis (1 x 10⁷/kg) de células T autólogas sometidas a pulsos con péptido IE de CMV (T-APC) en el macaco A99171 dos meses después de administrar las células T derivadas de T_{CM} modificadas con Δ CD19. Las T-APC sometidas a pulsos con péptido se lisaron eficientemente por el clon de células T específicas para CMV in vitro (Figura 6e). Dentro de los 7 días de la infusión de las T-APC, hubo un aumento de 4 a 5 veces en las cantidades absolutas de las células T específicas para IE tanto modificadas con Δ CD19 como endógenas en la sangre (Figura 6d). Por lo tanto, las células T de memoria, establecidas mediante transferencia adoptiva fueron tan capaces como las células T de memoria endógenas de expandirse en respuesta al antígeno in vivo.

Discusión

La pobre supervivencia de las células T transferidas de manera adoptiva que se dirigen a células infectadas o cancerosas se ha correlacionado con la falta de eficacia terapéutica en los ensayos clínicos^{14,16,16}. La persistencia y eficacia de las células T cultivadas puede mejorarse a veces por agotamiento de los linfocitos huésped antes de la transferencia de células para eliminar las células reguladoras y la competencia por las citocinas que favorecen la supervivencia, y por la administración de IL-2 después de la transferencia de células^{16,17}. Sin embargo, el éxito de estas intervenciones no ha sido uniforme en cuanto a mejorar la persistencia de las células lo que sugiere que las propiedades intrínsecas de las células T aisladas para una terapia adoptiva pueden ser críticas para establecer una inmunidad duradera. Aquí, usamos el marcaje de genes para mostrar que los clones T_E CD8⁺ con especificidad antigénica derivados in vitro del subconjunto T_{CM} pero no de T_{EM}, persisten a largo plazo in vivo, ocupan los nichos de las células T de memoria, y readquieren propiedades fenotípicas y funcionales de T_{CM} después de la transferencia adoptiva.

Después de encontrar el antígeno in vivo, las células T experimentan proliferación y diferenciación programada inducidas por señales del TCR, moléculas coestimuladoras y de adhesión, y receptores de citocinas^{18,20,32}. Estos eventos dan como resultado la generación de gran cantidad de T_E que mueren a medida que el antígeno se elimina, y un grupo más pequeño

de T_{CM} y T_{EM} fenotípicamente distintas que persisten durante la vida y responden a la reexposición al antígeno con diferenciación a T_E . Los datos de estudios en animales murinos y seres humanos apoyan un modelo de diferenciación lineal en el que las T_{CM} dan lugar a ambas T_{EM} y T_E , aunque sigue siendo posible que T_{CM} y T_{EM} representen linajes separados^{18,33-35}. La capacidad de memoria de las células T para mantenerse durante la vida sugiere que al menos algunas T_M deben ser capaces de autorrenovación y diferenciación²³.

Los resultados presentados aquí sugieren que el aislamiento de T_{CM} para la inserción de genes puede proporcionar una población de células T reactivas a tumores con una capacidad mejorada para persistir después de la transferencia adoptiva.

Referencias

1. Cheever, M. A., y otros. Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors. *J.Immunol.* 125, 711-714 (1980).
2. Pahl-Seibert, M.-F. y otros. Highly protective in vivo function of cytomegalovirus IE1 epitope-specific memory CD8 T cells purified by T-cell receptor-based cell sorting. *J. Virol.* 79, 5400-5413 (2005).
3. Riddell, S. R. y otros. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257, 238-241 (1992).
4. Walter, E. A. y otros. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* 333, 1038-1044 (1995).
5. Rooney, C. M. y otros. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92, 1549-1555 (1998).
6. Dudley, M. E. y otros. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854 (2002).
7. Bollard, C. M. y otros. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J.Exp.Med.* 200, 1623-1633 (2004).
8. Dudley, M. E. y otros. Adoptive cell transfer therapy following nonmyeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23,2346-2357 (2005).
9. Gattinoni, L., Powell Jr, D. J., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 383-393 (2006).
10. Blattman, J. N. & Greenberg, P. D. Cancer Immunotherapy: A treatment for the masses. *Science* 305, 200-205 (2004).
11. Kessels, H. W. H. G. y otros. Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat. Immunol.* 2, 957-961 (2001).
12. Stanislawski, T. y otros. Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat.Immunol.* 2, 962-970 (2001).
13. Brentjens, R. J. y otros. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat.Med.* 9, 279-286 (2003).
14. Morgan, R. A. y otros. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science advance online publication agosto 31, (2006). DOI: 10.1126/science.1129003*
15. Bleakley, M. & Riddell, S. R. Molecules and mechanisms of the graftversus-leukemia effect. *Nat.Rev.Cancer* 4, 371-380 (2004).
16. Dudley, M. E. y otros. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J.Immunother.* 24, 363-373 (2001).
17. Yee, C. y otros. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 99, 16168-16173 (2002).
18. Sallusto, F. y otros. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu.Rev.Immunol.* 22, 745-763 (2004).
19. Butcher, E. C. & Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66 (1996).
20. Wherry, E. J. y otros. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat.Immunol.* 4, 225-234 (2003).
21. Dudley, M. E. y otros. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J.Immunother.* 25, 243-251 (2002).
22. Gattinoni, L. y otros. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J.Clin.Invest.* 115, 1616-1626 (2005).
23. Fearon, D. T. y otros., Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. *Science* 293, 248-250 (2001).
24. Zhang, Y. y otros. Host-reactive CD8+memory stem cells in graft-versus host disease. *Nat.Med* 11, 1299-1305 (2005).
25. Pitcher, C. J. y otros. Development and homeostasis of T cell memory in rhesus macaque. *J.Immunol.* 168, 29-43 (2002).
26. Sopper, S. y otros. Impact of simian immunodeficiency virus (SIV) infection on lymphocyte numbers and T-cell turnover in different organs of rhesus monkeys. *Blood* 101, 1213-1219 (2003).
27. Vermes, I. y otros. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods* 184, 39-51 (1995).
28. Schluns, K. S. y otros. Requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J.Immunol.* 168, 4827-4831 (2002).

29. Becker, T. C. y otros. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J.Exp.Med.* 195, 1541-1548 (2002).
30. Marks-Konczalik, J. y otros. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 97, 11445-11450 (2000).
- 5 31. Berger, C. y otros, Analysis of transgene-specific immune responses that limit the in vivo persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 107, 2294-2302 (2006).
32. Masopust, D. y otros, The role of programming in memory T-cell development. *Curr.Opin.Immunol* 16, 217-225 (2004).
33. Appay, V. y otros Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat.Med.* 8, 379-385 (2002).
- 10 34. Marzo, A. L. y otros. Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. *Nat. Immunol.* 6, 793-799 (2005).
35. Lefrançois, L. & Marzo, A. The descent of memory T-cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 618-623 (2006).
36. Kaech, S. M. y otros Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat.Immunol.* 4, 1191-1198 (2003).
- 15 37. Willinger, T. y otros. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J.Immunol.* 175, 5895-5903 (2005).
38. Wilson, C. B. & Merckenschlager, M. Chromatin structure and gene regulation in T cell development and function. *Curr.Opin.Immunol.* 18, 143-151 (2006).
- 20 39. Klebanoff, C. A. y otros. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 102, 9571-9576 (2005).
40. Lee, P. P. y otros. Characterization of circulating T cells specific for tumorassociated antigens in melanoma patients. *Nat.Med.* 5, 677-685 (1999).
41. Groh, V., Wu, J., Yee, C., & Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734-738 (2002).
- 25 42. Sadelain, M., Rivière, I., & Brentjens, R. J. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat.Rev.Cancer* 3, 35-45 (2003).
43. Engels, B. y otros. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum.Gene Ther.* 14, 1155-1168 (2003).
- 30 44. Riddell, S. R. y otros. T-cell mediated rejection of gene-modified HIVspecific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat.Med.* 2, 216-223 (1996).
45. Berger, C. y otros. Nonmyeloablative immunosuppressive regimen prolongs in vivo persistence of gene-modified autologous T cells in a nonhuman primate model. *J. Virol.* 75, 799-808 (2001).
46. Barratt-Boyes, S. M. y otros. Maturation and trafficking of monocyte derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. *J.Immunol.* 164, 2487-2495 (2000).
- 35 47. Berger, C. y otros Pharmacologically regulated Fas-mediated death of adoptively transferred T cells in a nonhuman primate model. *Blood* 103, 1261-1269 (2004).
48. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986-994 (1996).
49. Rufer, N. y otros. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat.Biotechnol.* 16, 743-747 (1998).
- 40 50. Baerlocher, G. M. & Lansdorp, P. M. Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. *Cytometry A* 55A, 1-6 (2003).

Reivindicaciones

1. Un método para obtener una preparación de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ de primate, útil para la inmunoterapia adoptiva que comprende las etapas de:
(a) enriquecer una población de linfocitos T obtenida de un primate donante para una subpoblación de linfocitos T de memoria central CD62L⁺ CD8⁺ (T_{CM}), para generar así una composición enriquecida de T_{CM} que está enriquecida de linfocitos T_{CM} CD62L⁺ y agotada de linfocitos T de memoria efectoras CD62L⁻ (T_{EM}); y
(b) expandir las células de la composición enriquecida de T_{CM} *in vitro*, opcionalmente en presencia de interleucina (IL) 15, para producir una preparación de CTL enriquecida de CTL derivados de T_{CM}, la preparación de CTL comprende células T efectoras (T_E), en donde las células T_E tienen una disminución de la expresión de CD62L en comparación con la composición enriquecida de T_{CM} de la etapa (a).
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la preparación de CTL enriquecida de T_{CM} comprende células T efectoras CD8⁺ (T_E) (i) que son positivas para la granzima B y/o perforina, y/o (ii) que son rescatadas de la muerte celular mediante la adición de IL-15 en un cultivo *in vitro*.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la etapa de expansión se lleva a cabo en presencia de IL-15 e IL-2.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición de T_{CM} de la etapa (a) comprende 40 % o menos de los linfocitos T_{EM} antes de la etapa (b).
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende, además, modificar genéticamente *in vitro* la composición enriquecida de T_{CM} de la etapa (a) con al menos un gen que dirige a las células cancerosas u otras células patogénicas, preferentemente el gen es un inmunorreceptor modificado genéticamente.
6. Una preparación de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ de primate, útil para la inmunoterapia adoptiva, obtenida del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la preparación de CTL está enriquecida de células T efectoras CD8⁺ de primate (T_E) que tienen disminución de la expresión de CD62L en comparación con las células T de memoria central CD8⁺ (T_{CM}), y que persisten después de la transferencia adoptiva a un sujeto *in vivo* durante al menos 5 días; preferentemente al menos 14 días; opcionalmente que comprende células modificadas genéticamente con un gen que dirige a las células cancerosas u otras células patogénicas, preferentemente el gen es un inmunorreceptor modificado genéticamente.
7. Una preparación de CTL CD8⁺ de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la preparación de CTL comprende 60 % o más de las células T efectoras CD8⁺ (T_E) de primate.
8. Una preparación de CTL CD8⁺ de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la preparación de CTL consiste esencialmente en las células T efectoras CD8⁺ (T_E) de primate.
9. Una preparación de CTL CD8⁺ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde las células en un cultivo *in vitro* son rescatadas de la muerte celular mediante la adición de IL-15 en comparación con las células T efectoras CD8⁺ (T_E) derivadas de las células T de memoria efectoras CD8⁺ (T_{EM}).
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una preparación de CTL CD8⁺ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde la preparación de CTL se formula en un portador farmacéuticamente aceptable.
11. Una preparación de CTL CD8⁺ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 para usar en la inmunoterapia adoptiva en un sujeto humano.
12. La preparación de CTL CD8⁺ para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la preparación de CTL es alogénica al sujeto, singénica al sujeto, o autóloga al sujeto.
13. La preparación de CTL CD8⁺ para el uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde la inmunoterapia adoptiva comprende una administración concurrente de interleucina 15 al sujeto en una cantidad eficaz para aumentar la proliferación de la preparación de CTL CD8⁺ en el sujeto.
14. La preparación de CTL CD8⁺ para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde (a) el sujeto padece de cáncer; preferentemente el cáncer es cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer hepático, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer óseo, tumor cerebral, carcinoma de células escamosas, melanoma, leucemia, o mieloma; o (b) en donde el sujeto padece de una enfermedad infecciosa; preferentemente una infección viral, infección bacteriana o infección protozoaria.

15. La preparación de CTL CD8⁺ para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el sujeto es inmunodeficiente.

5

10

15

20

25

30

35

40

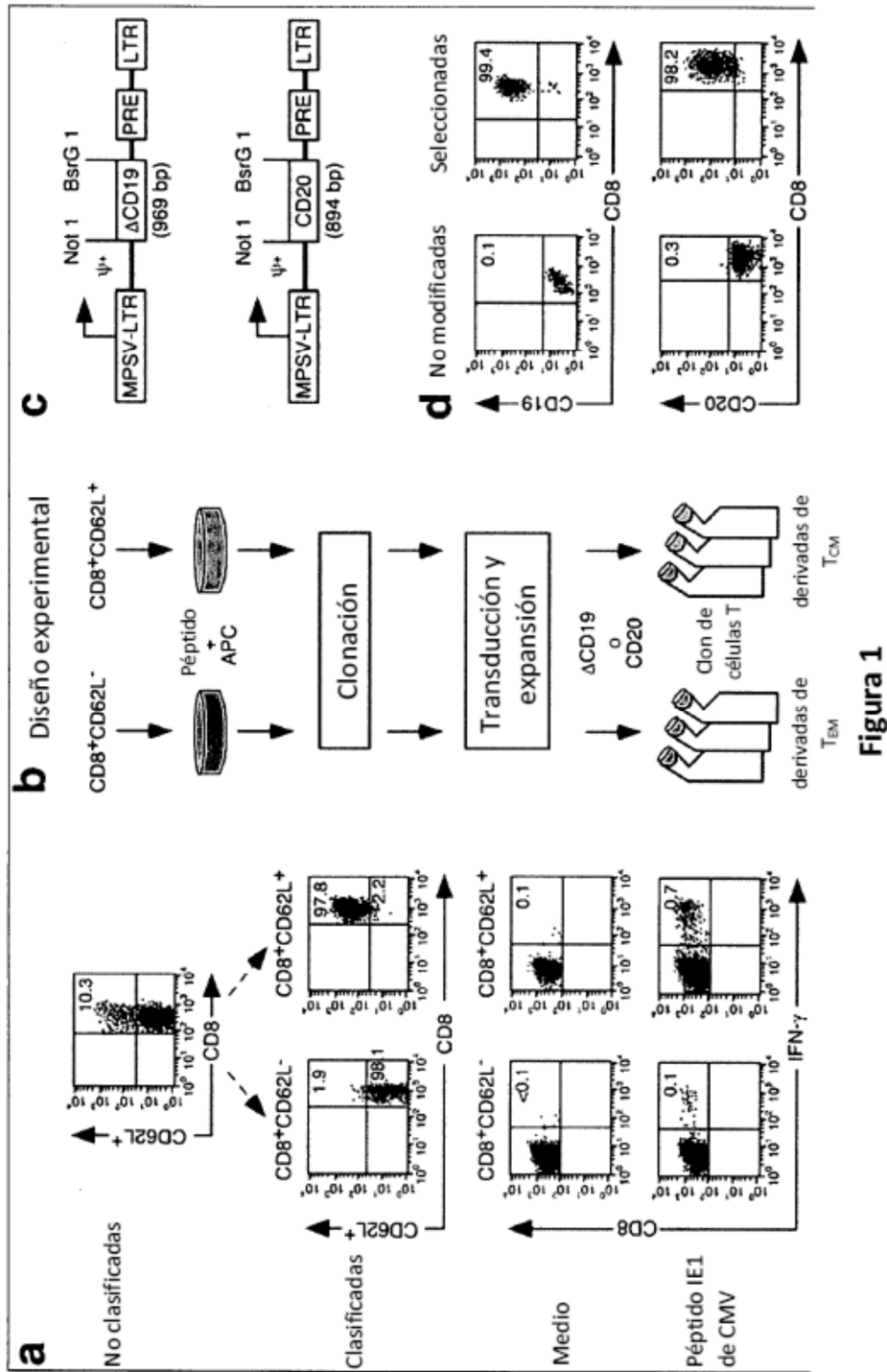
45

50

55

60

65



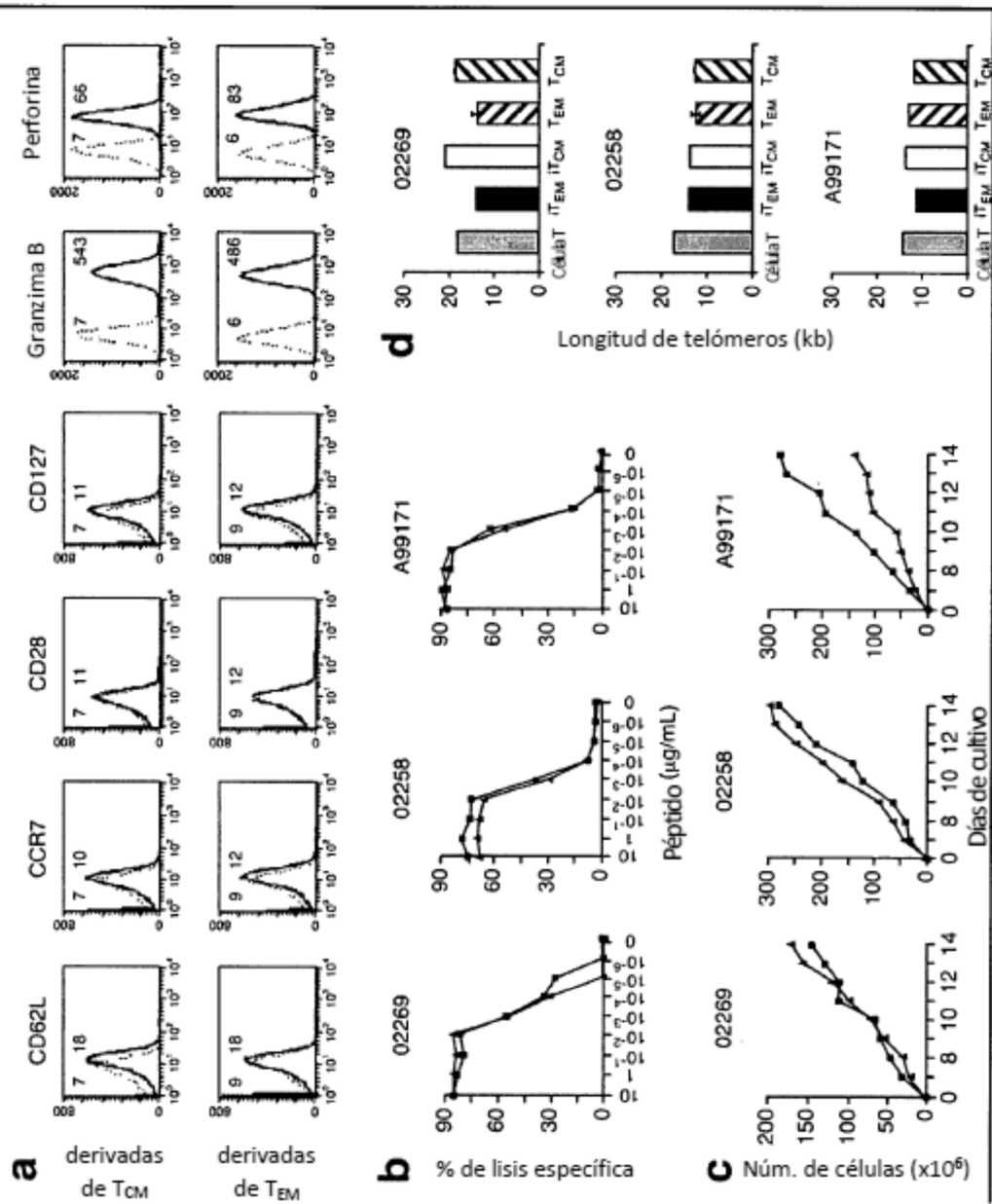


Figura 2

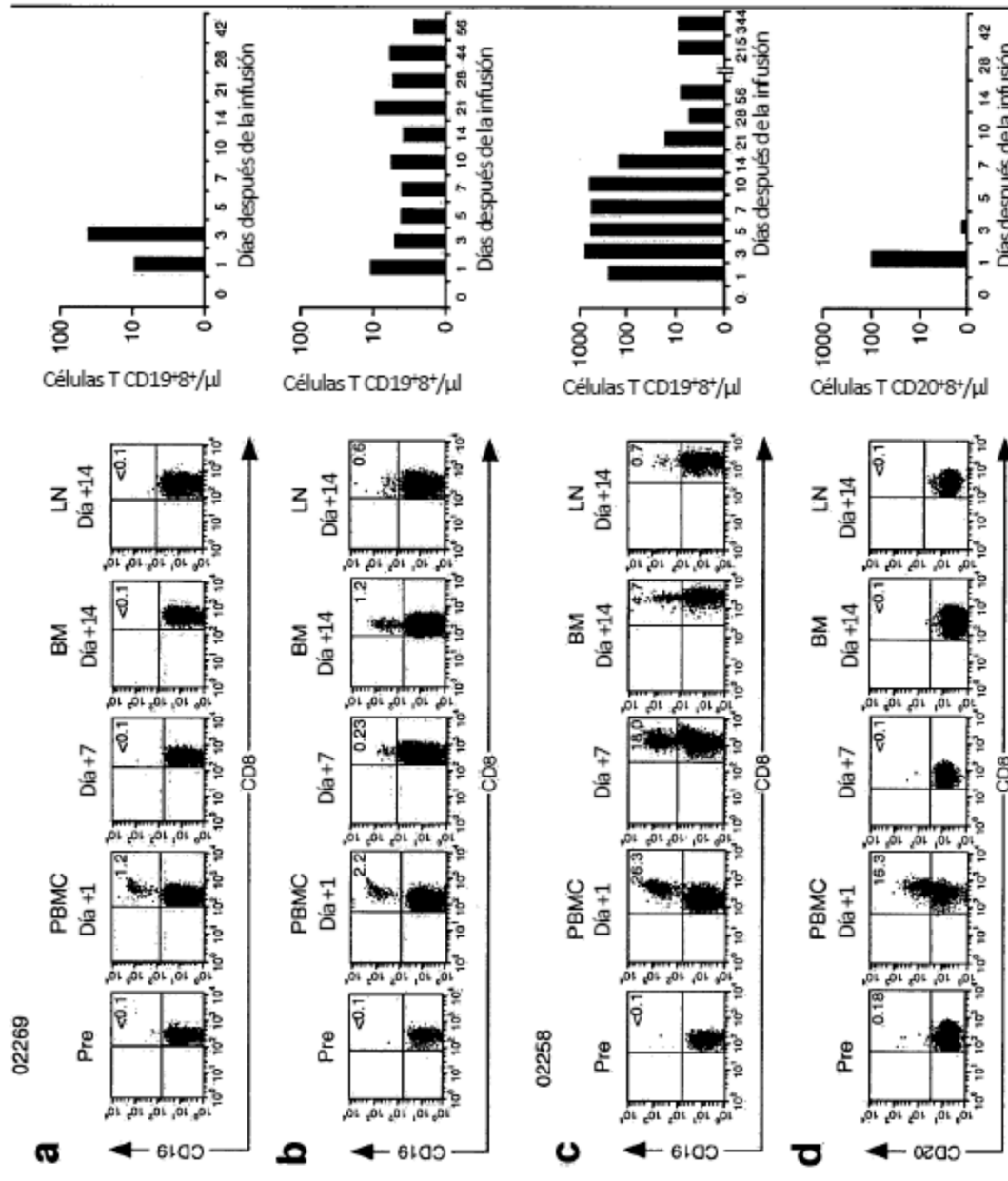


Figura 3

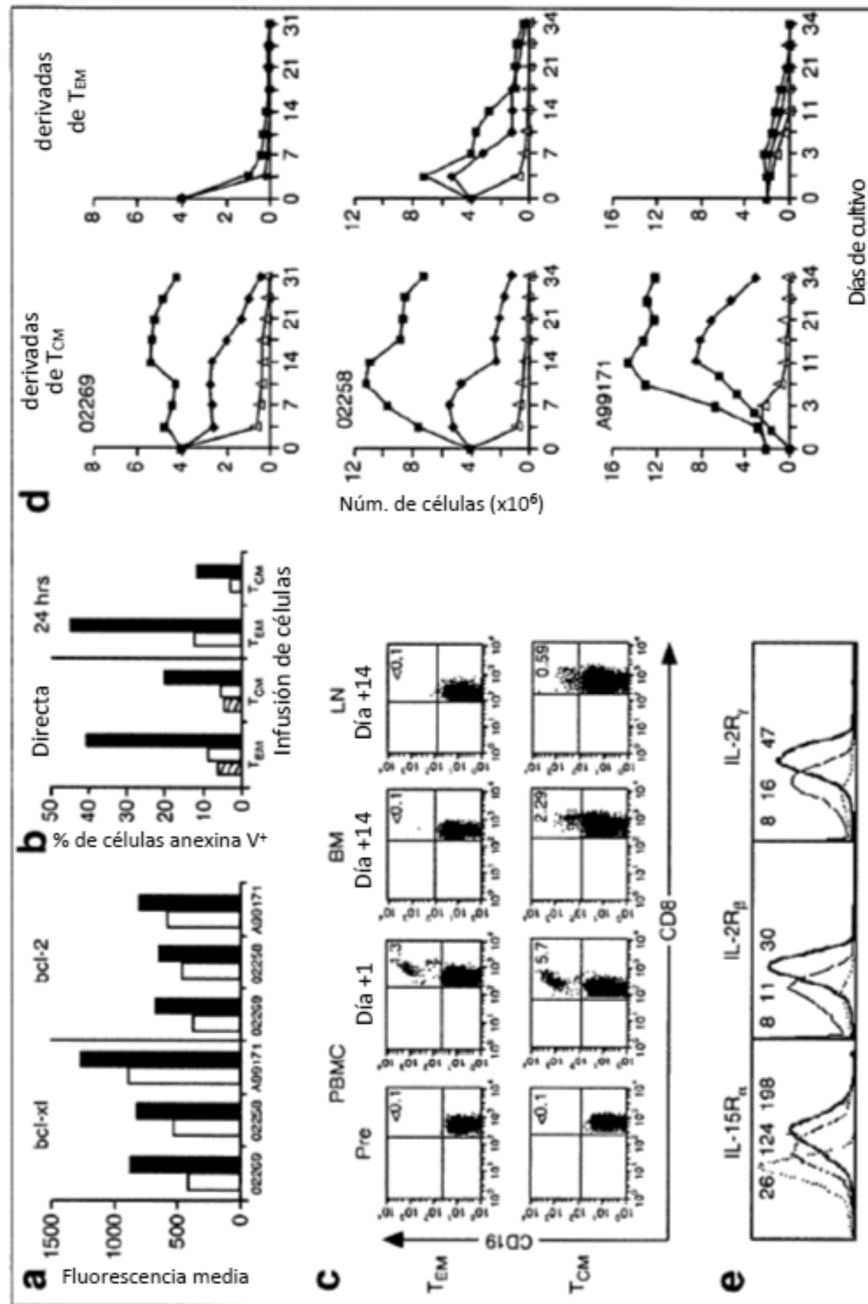
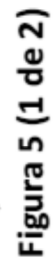


Figura 4



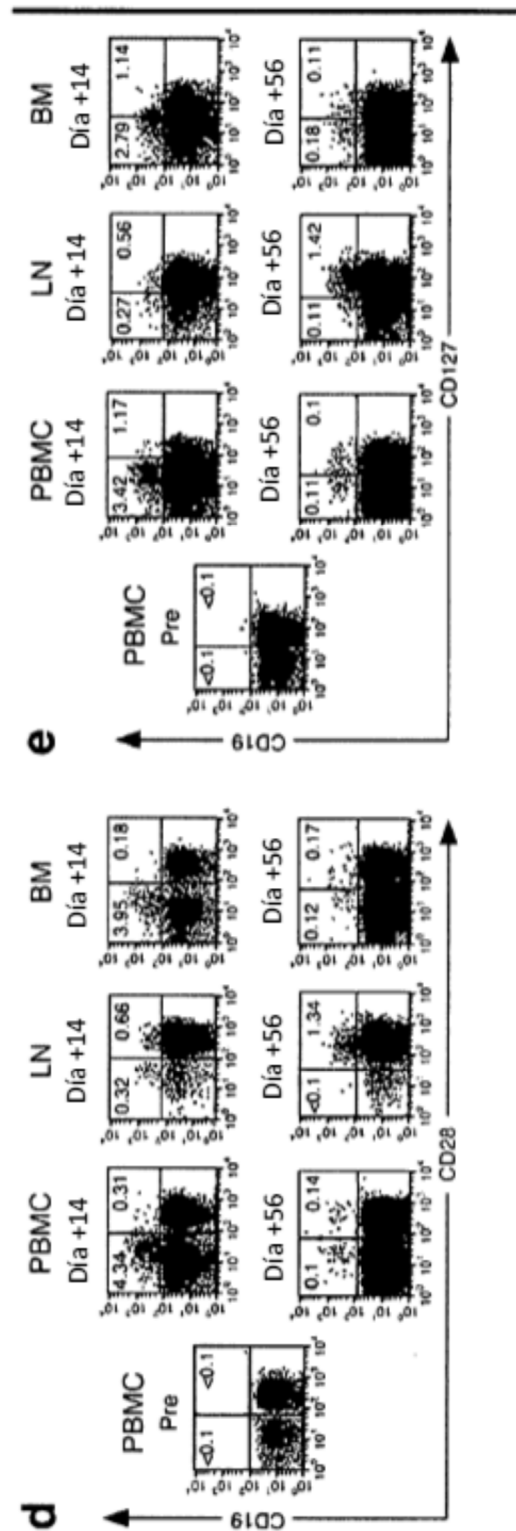


Figura 5 (2 de 2)

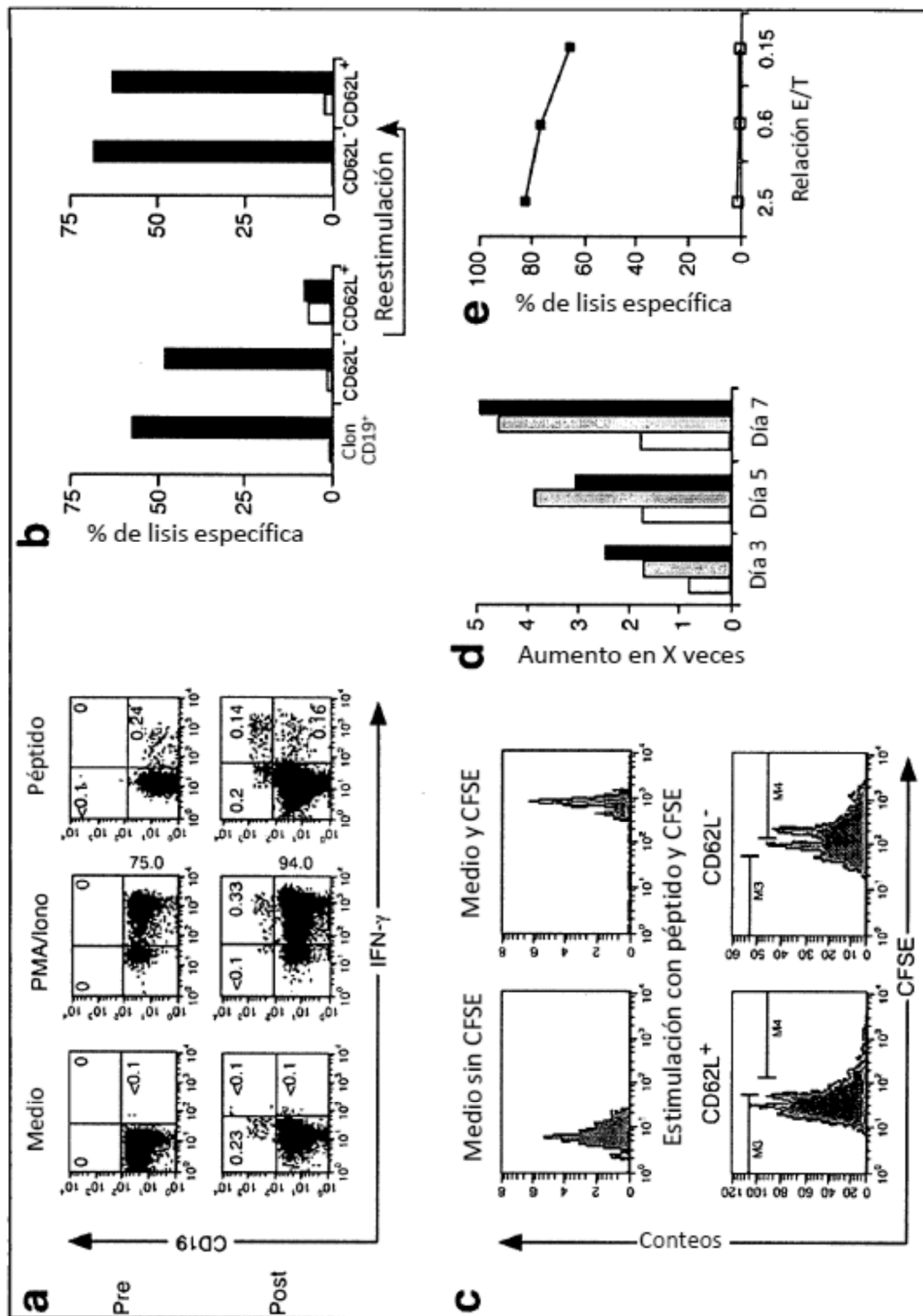


Figura 6