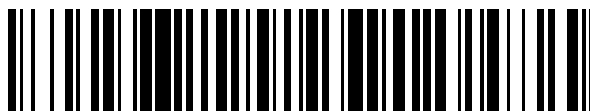


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 451**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/14 (2015.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2011** **PCT/US2011/023744**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011** **WO11097477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2011** **E 11740423 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019** **EP 2531216**

54 Título: **ICOS regula fundamentalmente la expansión y la función de linfocitos Th17 humanos inflamatorios**

30 Prioridad:

04.02.2010 US 301506 P

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

11.09.2019

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
Center for Technology Transfer, 3160 Chestnut
Street, Suite 200
Philadelphia PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**RILEY, JAMES L.;
PAULOS, CHRYSTAL;
JUNE, CARL H. y
LEVINE, BRUCE**

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 724 451 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

ICOS regula fundamentalmente la expansión y la función de linfocitos Th17 humanos inflamatorios

5 Antecedentes de la invención

Los linfocitos T (células T) CD4⁺ son importantes para regular la inmunidad frente a patógenos, respuestas alérgicas, asma e inmunidad a tejidos propios o tumorales (Zhu et al., 2010 Annu. Rev. Immunol. 28:445-489; Muranski et al., 2009 N. P. Restifo, Curr. Opin. Immunol. 21:200-208; Zhu et al., 2008 Blood 112:1557-1569),
 10 Dependiendo de las señales microambientales presentes, los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados pueden diferenciarse en uno de varios linajes de linfocitos T colaboradores (TH, de sus siglas en inglés), incluidos los linfocitos TH1, TH2, Th17, TH22 y T reguladores (Treg) (O'Shea et al., 2010 Science 327:1098-1102; Murphy et al., 2010 Nat. Immunol. 11:674-680). Los linfocitos TH1 y TH2 son células efectoras que expresan T-bet y GATA-3, respectivamente (Zhu et al., 2010 Annu. Rev. Immunol. 28:445-489). Por el contrario, los linfocitos Treg suprimen las funciones de los
 15 linfocitos T efectores y son esenciales para regular las respuestas autoinmunitarias (Tang et al., 2006 Immunol. Rev. 212: 217-237), y los linfocitos TH22 recientemente descritos secretan interleucina-22 (IL-22) y podría ser un subconjunto de células responsables de la inflamación de la piel (Duhon et al., 2009 Nat. Immunol. 10:857-863; Trifari et al., 2009 Nat. Immunol. 10:864-871). Los linfocitos Th17 aumentan la defensa del hospedador, tienen un papel importante en la inmunidad de la mucosa, mejoran varias enfermedades autoinmunitarias y liberan citocinas, incluidas IL-17A e IL-17F (Korn et al., 2009 Annu. Rev. Immunol. 27:485-517). La contribución de los linfocitos Th17 a la inmunidad tumoral varía, lo que muestra el potencial de actividad antitumorigénica y protumorigénica (Zou et al., 2010 Nat. Rev. Immunol. 10:248-256). Por lo tanto, la identificación de los mecanismos que controlan las respuestas de Th 17 es esencial para entender la inmunidad del tumor. Las funciones de las citocinas (por ejemplo, factor de crecimiento transformante β (TGF- β), IL-6, IL-1b, IL-21 e IL-23) y factores de transcripción (como RORC2 y RORa)
 25 en el desarrollo de linfocitos Th17 humanos son distintas de los linfocitos efectores TH1 y TH2 (Zhou et al., 2009 Curr. Opin. Immunol. 21:146-152; Manel et al., 2008 Nat. Immunol. 9:641-649; Yang et al., 2008 Nature 454:350-352; Volpe et al., 2008 Nat. Immunol. 9:650-657). Además, los agonistas naturales para el receptor de hidrocarburos de arilo (AHR, de sus siglas en inglés) aumentan la diferenciación de linfocitos Th17 murinos (Veldhoen et al., 2009 J. Exp. Med. 206:43-49). Sin embargo, las vías coestimuladoras específicas que pueden influir en la generación y la
 30 estabilidad de Th17 aún no se han dilucidado.

Las señales coestimuladoras específicas de antígeno y no específicas de antígeno de las células presentadoras de antígeno (APC, de sus siglas en inglés) son necesarias para la activación, diferenciación y función de los linfocitos T (Greenwald et al., 2005 Annu. Rev. Immunol. 23:515-548). Se considera que CD28 es la molécula de señalización
 35 primaria en los linfocitos T CD4⁺ debido a su expresión temprana, y se utiliza a menudo para generar linfocitos productores de IL-17 (Manel et al., 2008 Nat. Immunol. 9:641-649; Yang et al., 2008 Nature 454:350-352; Volpe et al., 2008 Nat. Immunol. 9:650-657; Acosta-Rodriguez et al., 2007 Nat. Immunol. 8:942-949; Acosta-Rodriguez et al., 2007 Nat. Immunol. 8:639-646; Wilson et al., 2007 Nat. Immunol. 8:950-957). Sin embargo, además de CD28, se requiere la señalización a través del coestimulador inducible (ICOS, de sus siglas en inglés, también llamado CD278)
 40 para la secreción óptima de citocinas, porque ambas moléculas son esenciales para la secreción óptima de IL-17A por los linfocitos Th17 murinos (Park et al., 2005 Nat. Immunol. 6:1133-1141). Hallazgos recientes en modelos murinos han revelado que ICOS amplifica las respuestas de Th17 mediante la inducción de la expresión del factor de transcripción c-MAF y, por lo tanto, transactiva la producción de IL-21 (Banquet et al., 2009 Nat. Immunol. 10:167-175).

El documento US2004110290 se refiere a métodos para activar y expandir células utilizando una plataforma de señalización multivalente diseñada por ingeniería genética. El documento WO2009155477 se refiere a métodos y composiciones para convertir no Treg en iTreg, que son útiles para regular una respuesta inmunitaria. El documento WO2010099205 se refiere en general al tratamiento de la leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML, de sus
 50 siglas en inglés) mediante infusión de linfocitos autólogos activados y expandidos. Riley J. L. et al. (J Immunol, 15 de abril de 2001, 166 (8) 4943-4948) se refiere a la coestimulación con ICOS que requiere IL-2, y que se puede prevenir mediante la vinculación de CTLA-4. Aunque tanto CD28 como ICOS son importantes para la generación de linfocitos Th17 murinos, sus roles particulares en la regulación de genes clave en linfocitos Th17 humanos aún no se han identificado. La presente invención satisface esta necesidad en la materia.

55 Sumario de la invención

El objeto de estudio de la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

60 La invención proporciona una composición que comprende un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a un linfocito T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en dicho linfocito T, donde el segundo agente es un anticuerpo anti-ICOS, y que comprende además un agente polarizante de Th17, donde el agente polarizante se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IL-23, anticuerpo anti-IFN γ neutralizante y anticuerpo anti-IL-4 neutralizante.

65 La invención proporciona además una composición que comprende un primer agente que es capaz de proporcionar

una señal de activación primaria a un linfocito T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en dicho linfocito T, donde el segundo agente es un anticuerpo anti-ICOS, y que comprende además un agente polarizante de Th17, donde el agente polarizante se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IL-23, anticuerpo anti-IFN γ neutralizante y anticuerpo anti-IL-4 neutralizante, para su uso en un método de regulación de un linfocito Th17 en un mamífero.

Además, se desvela una composición que comprende un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a un linfocito T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en dicho linfocito T.

En una realización, la que comprende es una superficie en fase sólida. En otra realización, la composición es una línea celular humana. En otra realización más, la línea celular humana se selecciona del grupo que consiste en células K562, U937, 721.221, T2 y C1R.

En una realización, la célula se modifica genéticamente para expresar un receptor Fc γ humano. En otra realización, el receptor Fc γ se selecciona del grupo que consiste en CD32, CD64, y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, el primer agente se une a CD3 o a un componente del complejo TCR/CD3. En otra realización, el segundo agente es un anticuerpo anti-ICOS.

Además se desvela un segundo agente que es ICOS-L.

En otra realización, la célula se modifica además genéticamente para expresar dicho segundo agente. En otra realización, la célula se modifica adicionalmente para expresar una citocina. En otra realización más, la citocina se selecciona entre el grupo que consiste en IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-23 y cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, la célula se modifica adicionalmente para expresar una molécula inhibidora que inhibe una citocina que interfiere con el proceso de diferenciación de Th17. Preferentemente, la citocina que interfiere con el proceso de diferenciación de Th17 se selecciona del grupo que consiste en IFN γ , IL-4, y cualquier combinación de los mismos.

Además, se desvela un método para activar o estimular una población de linfocitos T. El método comprende: 1) proporcionar una población de células donde al menos una parte de la misma comprende linfocitos T; 2) poner en contacto la población de células con una composición que comprende un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a los linfocitos T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en dichos linfocitos T.

La presente invención proporciona además un método *in vitro* para activar o estimular una población de linfocitos T, comprendiendo dicho método: 1) proporcionar una población de células donde al menos una parte de la misma comprende linfocitos T; 2) poner en contacto dicha población de células con una composición que comprende un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a dichos linfocitos T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en dichos linfocitos T, donde el segundo agente es un anticuerpo anti-ICOS, y que comprende además un agente polarizante de Th17, donde el agente polarizante se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IL-23, anticuerpo anti-IFN γ neutralizante y anticuerpo anti-IL-4 neutralizante.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una población de linfocitos Th17 expandidos cultivados producidos por el método *in vitro* anterior que muestra actividad antitumoral, donde dichas células se expanden a un número suficiente para una terapia eficaz en un mamífero.

Además, se desvela el contacto de la población de células con una composición que comprende un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a los linfocitos T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en los linfocitos T en presencia de un agente polarizante de Th-17.

En una realización, el agente polarizante de Th-17 se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, anti-IFN γ neutralizante, anti-IL-4, y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, los linfocitos T son linfocitos T CD4+.

En otra realización, los linfocitos T son linfocitos T del cordón umbilical.

En otra realización, los linfocitos T son linfocitos T periféricos.

En una realización, los linfocitos T secretan niveles elevados de IL-17A, IL-17F y CCL20 después de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho rondas de estimulación en comparación con las células coestimuladas con CD28.

En una realización, los linfocitos T secretan niveles elevados de IFN γ , TNF α e IL-21 en comparación con la

coestimulación con CD28.

En otra realización, los linfocitos T se ponen en contacto con un antígeno. En una realización, el antígeno es un antígeno tumoral. Además, se desvela un linfocito T estimulado con ICOS para su uso en un método de inmunoterapia que comprende administrar un linfocito T estimulado con ICOS a un paciente que lo necesita. En una realización, el linfocito T estimulado con ICOS se ha puesto en contacto con un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a los linfocitos T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en los linfocitos T en presencia de un agente polarizante de Th-17

En una realización, el agente polarizante de Th-17 se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, anti-IFN γ neutralizante, anti-IL-4, y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, el primer agente se une a CD3 o a un componente del complejo TCR/CD3. En otra realización, el segundo agente es un anticuerpo anti-ICOS o ICOS-L.

En una realización, el Th17 se pone en contacto con un antígeno.

La presente invención también proporciona una población de linfocitos Th17 expandidos cultivados que muestran actividad antitumoral, donde la actividad antitumoral se mantiene a largo plazo y donde las células se expanden a un número suficiente para una terapia eficaz en un mamífero.

En un aspecto, la invención proporciona un linfocito T estimulado con ICOS para su uso en un método de inmunoterapia, donde dicho linfocito T estimulado con ICOS se ha puesto en contacto con un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a los linfocitos T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en linfocitos T, donde el segundo agente es un anticuerpo anti-ICOS, y que comprende además un agente polarizante de Th17, donde el agente polarizante se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IL-23, anticuerpo anti-IFN γ neutralizante y anticuerpo anti-IL-4 neutralizante.

La invención también desvela un método para regular un linfocito Th17 en un mamífero. El método comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de composición que comprende un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a un linfocito T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en dicho linfocito T.

Breve descripción de los dibujos

A fin de ilustrar la invención, se representan en los dibujos ciertas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones e instrumentos precisos de las realizaciones representadas en los dibujos.

La Figura 1, que comprende las Figuras 1A a 1C, es una serie de imágenes que representan distintas expresiones y funciones de ICOS y CD28 en subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ humanos. La Figura 1A es una imagen que demuestra que la expresión de las moléculas coestimuladoras ICOS y CD28 se evaluó en los subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica humana en reposo, que consiste en linfocitos CXCR3⁺CCR4⁺CCR6⁺ Th1, CCR4⁺CXCR3⁺CR6⁺ Th2, CCR4⁺CCR6⁺Th17, CD25⁺CD127^{lo}FoxP3⁺Treg, y CXCR5⁺CD45RO⁺ TFH. La Figura 1B es una imagen que muestra la cuantificación citométrica de flujo de ICOS y CD28 en diferentes subconjuntos de varios donantes normales (n = 7). Las barras horizontales indican la media; ns = no significativo. La Figura 1C es una imagen que muestra las citocinas IL-2 (i), IL-4 (ii), IFN- γ (iii), IL-10 (iv), IL-22 (v), IL-17A (vi), IL-17F (vii), CCL20 (viii), e IL-21 (ix) secretadas a partir de diversas células clasificadas activadas con anticuerpos contra perlas CD3/CD28 o CD3/ICOS y mediadas el día 3 mediante ELISA. Las estadísticas se corrigieron para comparaciones múltiples con la prueba ANOVA Scheffé. TFH (follicular helper T) = linfocito T colaborador folicular.

La Figura 2, que comprende las Figuras 2A a 2G, es una serie de imágenes que demuestran que ICOS aumenta la producción de citocinas mediante linfocitos Th17 humanos. La Figura 2A es una imagen que demuestra que la producción de IL-17F se evaluó mediante linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica diferenciados a un fenotipo Th17 con condiciones de polarización Th17 (anticuerpos IL-6, IL-1 β , IL-23, IFN- γ neutralizantes e IL-4 neutralizantes en suero que contiene TGF- β , una citocina requerida para inducir la diferenciación de Th17) y activados con aAPC que expresan CD86, CD80, CD70, ICOSL, OX40L o 4-1BBL o con perlas que llevan anticuerpos contra CD3 y CD28 el día 3 mediante ELISA. La Figura 2B es una imagen que demuestra que la producción de IL-17F se evaluó mediante linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica cultivados con o sin condiciones de polarización Th17 y activados con aAPC diseñada para expresar ICOSL o con perlas que llevan anticuerpos contra CD3/ICOS el día 3. La Figura 2C a 2G muestra las mediciones de la secreción o expresión de (C) IL-17F, (D) IL-17A, (E) IL-2, (F) IL-22 y (G) IL-10 mediante linfocitos T CD4⁺ polarizados a Th17 activados con perlas que llevan anticuerpos contra CD3, CD28 y/o ICOS en el día 3 utilizando ELISA o PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

La Figura 3, que comprende las Figuras 3A a 3G, es una serie de imágenes que demuestran que ICOS es fundamental para la expansión de los linfocitos Th17 humanos. Las Figuras 3 A y 3B representan la frecuencia y el

número absoluto, respectivamente, de linfocitos T CCR4+CCR6+CD4+ evaluadas con el tiempo mediante citometría de flujo a partir de linfocitos T CD4+ de sangre periférica cultivados en condiciones de polarización Th17 y activados con anticuerpos contra perlas CD3/CD28 o CD3/ICOS. La Figura 3C es una imagen que demuestra que la expresión de CD27 y CD62L se midió el día 10 en estas células con citometría de flujo. La Figura 3D demuestra que en los días indicados, los linfocitos T CD4+ polarizados a Th17 y comprometidos con CD28 o ICOS se estimularon con PMA-ionomicina y la frecuencia de las células secretoras de IL-17A y IFN- γ se evaluó mediante citometría de flujo. La Figura 3E es una imagen que demuestra que la frecuencia de las células polarizadas a Th17 y comprometidas con CD28 o ICOS que producen IL-17A y/o IFN- γ se determinó al final de su expansión primaria (que va desde los días 9 a 14) en varios donantes normales diferentes (n = 8). Las Figuras 3F y 3G demuestran la expresión de RORC2 y T-bet, respectivamente, en estas células tratadas medidas utilizando RT-PCR en los días 3 y 10.

La Figura 4, que comprende las Figuras 4A a 4F, es una serie de imágenes que demuestran que ICOS controla la diferenciación rápida de linfocitos Th17 a partir de linfocitos T CD4+ de UCB indiferenciados (naïve). Las Figuras 4A a 4C, son una serie de imágenes que demuestran que los linfocitos T CD45RA+CD25-CD4+ de UCB se cultivaron con condiciones de polarización Th17 y se expandieron con anticuerpos contra perlas CD3/CD28, CD3/ICOS o CD3/CD28/ICOS. A partir del día 3, se añadió IL-2 (50 UI/ml) a los cultivos. Los cultivos se estimularon con PMA-ionomicina (IONO) y la expresión intracelular de IL-17A, IFN- γ , IL-2 y TNF- α y la expresión extracelular de IL-23R y CD161 se evaluaron en el día 11. Las células de la Figura 4A a la Figura 4C se reactivaron con anticuerpos contra perlas acopladas a CD3 que llevan anticuerpos contra CD28 y/o ICOS. Las figuras 4D a 4F demuestran que los cultivos se reestimularon con PMA-ionomicina y la expresión intracelular de IL-17A, IFN- γ , IL-2 y TNF- α y la expresión extracelular de IL-23R y CD161 se evaluaron el día 18.

La Figura 5, que comprende las Figuras 5A a 5L, es una serie de imágenes que demuestran que CD28 e ICOS regulan diferencialmente la expresión de c-MAF, RORC2, y T-bet en linfocitos Th17 de UCB. Los linfocitos T CD4+ de UCB se cultivaron en condiciones de polarización Th17 y se expandieron con anticuerpos *contra* perlas CD3/CD28 o CD3/ICOS. Se añadió IL-2 (50 UI/ml) el día 3. Las Figuras 5A y 5B demuestran que en el día 5, la expresión de ARNm de c-MAF e IL-21 en células estimuladas con CD28 o ICOS se midió mediante RT-PCR. La Figura 5C demuestra que *en* el día 5, la producción de IL-17F en células estimuladas con CD28 cultivadas con IL-21 exógena e IL-2 de neutralización se midió mediante ELISA. Las Figuras 5D a 5L demuestran que en los días indicados, la producción de RORC2, T-bet, FoxP3, AHR, IL-22, IL-10, e IL-17A en células estimuladas con CD28 o ICOS se midió mediante citometría de flujo y RT-PCR.

La Figura 6, que comprende las Figuras 6A a 6E, es una serie de imágenes que demuestran que los linfocitos Th17 humanos se originan a partir de los precursores de linfocitos T ICOS+CD161+CD4+. La Figura 6A demuestra que la expresión de CD45RA, CD31, CD127, CD62L y CD27 se evaluó en los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ e ICOS-CD161+CD4+ de la UCB mediante citometría de flujo. La Figura 6B es una imagen que demuestra que la secreción de IL-17F, CCL20, IFN- γ , IL-4, IL-22 e IL-10 mediante linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ e ICOS-CD161+CD4+ clasificados cultivados con condiciones de polarización Th17 y expandidos con anticuerpos contra perlas CD3/CD28 o CD3/ICOS se evaluó el día 4 mediante ELISA. La Figura 6C es una imagen que muestra la frecuencia y el número absoluto de células CD161+ cultivadas con condiciones de polarización Th17 y expandidas con anticuerpos contra las perlas recubiertas con CD3/CD28 o CD3/ICOS que se determinaron el día 4 o en los días indicados, respectivamente. La Figura 6D es una imagen que muestra la expresión del ARNm de RORC2, IL-23R, AHR y FoxP3 en linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ e ICOS-CD161+CD4+ clasificados cultivados con condiciones de polarización Th17 y expandidos con anticuerpos contra las perlas recubiertas con CD3/CD28 o CD3/ICOS que se evaluaron el día 7 mediante RT-PCR. La Figura 6E es una imagen que demuestra que en el día 7, los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ e ICOS-CD161+CD4+ se cultivaron en medio solo o en condiciones de polarización TH1, TH2, Th17 y Treg y se expandieron con anticuerpos contra las perlas recubiertas con CD3/CD28 o CD3/ICOS, luego se estimularon con PMA-ionomicina y se evaluó la secreción de IL-17A mediante citometría de flujo.

La Figura 7, que comprende las Figuras 7A a 7F, es una serie de imágenes que demuestran que ICOS aumenta la inmunidad tumoral mediada por linfocitos T. Como se muestra esquemáticamente, los linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos se estimularon con anticuerpos contra las perlas CD3/CD28 o CD3/ICOS y se cultivaron con o sin condiciones de polarización Th17. Un día después, los linfocitos T activados con perlas se redirigieron genéticamente con un CAR que se une a la mesotelina. Después de su expansión primaria, las células redirigidas genéticamente (dos administraciones, 8 x 10⁶ células en total) se infundieron en ratones portadores de un gran tumor de mesotelina humano (M108) preestablecido durante 61 días (n = 8 ratones por grupo). Las Figuras 7A a 7D demuestran que el crecimiento del tumor se midió en ratones infundidos con células redirigidas genéticamente expandidas con la señal de ICOS o CD28 con o sin condiciones de polarización Th17. El crecimiento del tumor se analizó con un modelo lineal de efectos mixtos y mediante la aplicación de un enfoque de corrección de Bonferroni conservador (media $\pm$ EEM). La Figura 7E demuestra que los linfocitos T redirigidos se aislaron de los bazo del ratón (en el día 43) y se cultivaron con aAPC irradiadas que llevan mesotelina. La secreción de IL-17A y IFN- γ se analizó mediante citometría de flujo 24 horas después. La Figura 7F demuestra que el número absoluto de linfocitos T CD4+ y CD8+ se determinó en la sangre y el bazo en los días 21 y 43, respectivamente.

La Figura 8 es una imagen que demuestra que los linfocitos T CD45RA+CD25-CD4+ de UCB contienen pocas células CD161+IL-23R+. La expresión de los marcadores de superficie CD161 e IL-23R en linfocitos T

CD45RA+CD25-CD4+ se evaluó en células de sangre del cordón umbilical humano mediante citometría de flujo.

La Figura 9 es una imagen que demuestra que ICOS induce c-MAF e IL-21. Se cultivaron linfocitos T CD4+ de PB en condiciones de polarización Th17 (IL-1 β , IL-6, IL-23, más anti-IFN- γ neutralizante y antiIL-4) y se activaron con perlas anti-CD3 que llevan anticuerpos anti-CD28 o anti-ICOS. Después de su expansión primaria, sus niveles de expresión de ARNm de c-MAF e IL-21 se evaluaron mediante RT-PCR.

La Figura 10 es una imagen que demuestra que CD28 induce la expresión del receptor de hidrocarburo arilo. Los linfocitos T CD4+ de PB se programaron hacia un fenotipo Th17 y se activaron con perlas anti-CD3 que llevan anticuerpos anti-CD28 o anti-ICOS. Después de su expansión primaria, su nivel de expresión de ARNm de AHR en relación con la β -actina se evaluó mediante RT-PCR.

La Figura 11 es una imagen que demuestra que el TGF- β exógeno aumenta el potencial inflamatorio de los linfocitos TH17 humanos. Los linfocitos T CD4+ de PB se programaron hacia un fenotipo TH 17 y se activaron con perlas anti-CD3 que llevan anticuerpos anti-CD28 o 2 anti-ICOS en medios que contenían suero y el TGF- β complementario indicado (de 0,1-10 ng/ml) se añadió al cultivo el día 1. La secreción de IL-17 A mediante las células se midió el día 5 después de la activación mediante ELISA.

La Figura 12 es una imagen que demuestra que los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ de UCB expresan de manera constitutiva RORC2 e IL23R. Se clasificaron los linfocitos T CD4+, ICOS+CD161+CD4+ e ICOS-CD161+CD4+ y se midió su nivel de expresión de ARNm de RORC2 e IL-23R en relación con la β -actina mediante RT-PCR.

La Figura 13, que comprende las Figuras 13A a 13D, es una serie de imágenes que demuestran que los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ están impresos como linfocitos Th17. Los linfocitos T CD4+ e ICOS+CD161+CD4+ de UCB se clasificaron y se cultivaron en diversas condiciones de polarización como se indica. La frecuencia de las células IFN- γ + (Figura 13A), IL-4+ (Figura 13B), IL-17 A+ (Figura 13C) o FoxP3+ (Figura 13D) se midió después de su expansión primaria con perlas anti-CD3 que llevan anticuerpos anti-CD28 o anti-ICOS. Como control, los cultivos de control complementarios de linfocitos T CD4 de UCB en masa se estimularon con perlas antiCD3/CD28. Las citocinas y FoxP3 se midieron mediante citometría de flujo o ELISA en el día 7 del cultivo después de la estimulación con PMA/ionomicina.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones y métodos *in vitro* para su uso para expandir un linfocito T deseado, activar y/o expandir subconjuntos de linfocitos T específicos, identificar moléculas estimuladoras, moléculas coestimuladoras y combinaciones de las mismas, que pueden promover la expansión de subconjuntos de linfocitos T específicos, así como numerosos usos terapéuticos relacionados con la expansión y estimulación de linfocitos T. Preferentemente, el linfocito T es Th17.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la proliferación y la función de los linfocitos Th17 humanos varían considerablemente dependiendo de si reciben coestimulación con CD28 o con ICOS. La divulgación presentada en el presente documento demuestra que la coestimulación con ICOS promueve específicamente el crecimiento y aumenta la función de los linfocitos Th17 periféricos. Por el contrario, la coestimulación con CD28 anula el efecto de ICOS. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que la coestimulación de células precursoras indiferenciadas a partir de sangre de cordón humano con ICOS en presencia de agentes polarizantes de Th17 apoya la generación y expansión de linfocitos Th17, según lo indicado por su capacidad para secretar niveles elevados de IL-17A, IL-17F y CCL20. La coestimulación con ICOS no solo puede elevar los linfocitos Th17 para producir citocinas asociadas a Th17, sino también elevar la secreción de IFN γ , TNF α e IL-21 en comparación con la coestimulación con CD28.

En una realización, la coestimulación con ICOS en linfocitos T se puede lograr al poner en contacto el linfocito T con una célula presentadora de antígeno artificial (aAPC, artificial Antigen Presentig Cell) que comprende una molécula capaz de activar ICOS en el linfocito T.

En otra realización, la aAPC que comprende una molécula capaz de activar ICOS en linfocitos T se puede además diseñar para comprender una citocina que promueva la diferenciación de Th17. Dichas citocinas de diferenciación de Th17 incluyen, pero sin limitación a, IL-2, IL-6 e IL-1.

En otra realización más, la aAPC que comprende una molécula capaz de activar ICOS en linfocitos T también se puede diseñar para comprender una molécula inhibidora que puede bloquear una citocina que interfiere con el proceso de diferenciación de Th17. Por ejemplo, la aAPC se puede diseñar para secretar un anticuerpo neutralizante que puede inhibir una citocina que interfiere con la diferenciación de Th17. Una citocina que interfiere con el proceso de diferenciación de Th17 incluye, pero no se limita a, IFN γ e IL-4.

De importancia clínica, los linfocitos Th17 generados de acuerdo con los métodos de la invención se pueden utilizar en la inmunoterapia de transferencia adoptiva. Es decir, los linfocitos T humanos expandidos en presencia de la

coestimulación con ICOS median la regresión superior de tumores humanos establecidos en comparación con un linfocito T idéntico expandido en presencia de CD28. En una realización, las células diseñadas para ser capaces de activar ICOS en linfocitos T se pueden utilizar para estimular y expandir linfocitos Th17 *in vivo* como una forma de vacunación.

5

Definiciones

A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica para probar la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

10

También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitante.

15

Los artículos "un" y "uno/a" se utilizan en el presente documento para referirse a uno o 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.

20

Un "aminoácido" como se utiliza en el presente documento pretende incluir tanto aminoácidos naturales como sintéticos, y aminoácidos tanto D como L. "Aminoácido estándar" significa cualquiera de los veinte L-aminoácidos que se encuentran comúnmente en los péptidos de origen natural. "Restos de aminoácidos no estándar" significa cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos estándar, independientemente de si está preparado sintéticamente o procede de una fuente natural. Tal como se utiliza en el presente documento, "aminoácido sintético" también abarca aminoácidos modificados químicamente, que incluyen, pero no se limitan a, sales, derivados de aminoácidos (tales como amidas) y sustituciones. Los aminoácidos contenidos dentro de los péptidos y, particularmente, en el extremo carboxi o amino, pueden modificarse mediante metilación, amidación, acetilación o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la semivida circulante de un péptido sin afectar adversamente la actividad del péptido. Adicionalmente, un enlace disulfuro puede estar presente o ausente en los péptidos.

25

30

«Aproximadamente» tal como se utiliza en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible, como una cantidad, una duración temporal y similar, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$. Más preferentemente $\pm 5\%$, aún más preferentemente $\pm 1\%$, y todavía más preferentemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos desvelados.

35

El término "antígeno" o "Ag", como se utiliza en el presente documento, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede involucrar la producción de anticuerpos o la activación de células inmunofágicamente competentes específicas, o ambas. El experto en la materia entenderá que cualquier macromolécula, que incluye virtualmente todas las proteínas o péptidos, puede servir como un antígeno. Adicionalmente, los antígenos pueden proceder de ADN recombinante o genómico. Un experto en la materia entenderá que cualquier ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifica una proteína que provoca una respuesta inmunitaria, codifica, por lo tanto, un "antígeno" como se utiliza ese término en el presente documento. Adicionalmente, un experto en la materia entenderá que un antígeno no necesita estar codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es fácilmente evidente que la presente invención incluye, aunque no de forma limitativa, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en varias combinaciones para provocar la respuesta inmunitaria deseada. Además, un experto en la materia entenderá que un antígeno no necesita estar codificado por un "gen" en absoluto. Es evidente que un antígeno se puede generar sintetizado o puede proceder de una muestra biológica. Dicha muestra biológica puede incluir, pero no se limita a, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

40

45

50

El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente con un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas procedentes de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son normalmente tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)2, así como anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos humanizados (Harlow et al., 1999, en: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, en: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. utiliza 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

55

60

El término "agente", "ligando" o "agente que se une a una fracción de la superficie celular", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que se une a una población definida de células. El agente puede unirse a cualquier fracción de la superficie celular, como un receptor, un determinante antigénico u otro sitio de unión

65

presente en la población de células diana. El agente puede ser una proteína, péptido, anticuerpo y fragmentos de anticuerpo del mismo, proteínas de fusión, molécula sintética, una molécula orgánica (por ejemplo, una molécula pequeña), un carbohidrato o similares. Dentro de la memoria descriptiva y en el contexto de la estimulación de linfocitos T, anticuerpos y ligandos naturales se utilizan como ejemplos prototípicos de dichos agentes.

Las expresiones "agente que se une a una fracción de la superficie celular" y "fracción de la superficie celular", como se utiliza en el presente documento, se utilizan en el contexto de un par ligando/anti-ligando. Por consiguiente, estas moléculas deben considerarse como conjunto de moléculas complementarias/anti-complementarias que demuestran unión específica, generalmente de afinidad relativamente alta.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "autólogo" pretende referirse a cualquier material procedente del mismo individuo el cual se reintroducirá posteriormente en el individuo.

"Alogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal diferente de la misma especie.

"Xenogénico" se refiere a un injerto procedente de un animal de una especie diferente.

El término "cáncer", como se utiliza en el presente documento, se define como una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas se pueden diseminar localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Ejemplos de varios tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer cerebral, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y similares.

Una "región codificante" de un gen consiste en los restos 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 la transcripción del gen.

Una "región codificante" de una molécula de ARNm también consiste en los restos de nucleótidos de la molécula de ARNm que están emparejados con una región anti-codón de una molécula de ARN de transferencia durante la traducción de la molécula de ARNm o que codifican un codón de parada. La región de codificación puede incluir, por lo tanto, restos de nucleótidos correspondientes a restos de aminoácidos que no están presentes en la proteína madura codificada por la molécula de ARNm (por ejemplo, restos de aminoácidos en una secuencia de señal de exportación de proteínas).

"Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, como un gen, un ADNc o un ARNm, que sirven como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por lo tanto, un gen codifica 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 del ARNm y generalmente se proporciona en listas de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden denominarse codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

Salvo que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

La "cantidad eficaz" o la "cantidad terapéuticamente eficaz" se utilizan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material o composición, tal como se describe en el presente documento como eficaz para lograr un resultado biológico particular. Dichos resultados pueden incluir, pero no se limitan a, la inhibición de la infección por virus según se determine mediante cualquier medio adecuado en la materia.

Como se utiliza en el presente documento, "endógeno" se refiere a cualquier material de o producido dentro de un organismo, célula, tejido o sistema.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido de o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

El término "expresión" como se utiliza en el presente documento se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular dirigida mediante su promotor.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que se va a expresar. Un

vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula hospedadora o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la materia, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento", cuando se aplica a un ácido nucleico, se refiere a una subsecuencia de un ácido nucleico más grande. Un "fragmento" de un ácido nucleico puede tener una longitud de al menos aproximadamente 15 nucleótidos; por ejemplo, al menos aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos; al menos aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos, al menos aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 nucleótidos, al menos aproximadamente 1000 nucleótidos a aproximadamente 1500 nucleótidos; o aproximadamente 1500 nucleótidos a aproximadamente 2500 nucleótidos; o aproximadamente 2500 nucleótidos (y cualquier valor entero entre ellos).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento", cuando se aplica a una proteína o péptido, se refiere a una subsecuencia de una proteína o péptido más grande. Un "fragmento" de una proteína o péptido puede tener una longitud de al menos aproximadamente 20 aminoácidos; por ejemplo, al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud; al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, y al menos aproximadamente 400 aminoácidos de longitud (y cualquier valor entero entre ellos).

"Homólogo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la identidad de secuencia de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, tal como, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptidos. Cuando una posición de subunidad en las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La 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 son homólogas, las dos secuencias son 50 % homólogas; si el 90 % de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10) se emparejan o son homólogas, las dos secuencias son homólogas al 90 %. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 5'-ATTGCC-3' y 5'-TATGGC-3' comparten una homología del 50 %.

El término "inmunoglobulina" o "Ig", como se utiliza en el presente documento, se define como una clase de proteínas, que funcionan como anticuerpos. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. La IgA es el anticuerpo primario que está presente en las secreciones corporales, como la saliva, lágrimas, leche de materna, secreciones gastrointestinales y secreciones de moco de las vías respiratorias y genitourinarias. La IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la principal inmunoglobulina producida en la respuesta inmunitaria primaria en la mayoría de los mamíferos. Es la inmunoglobulina más eficaz en aglutinación, fijación del complemento y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que no tiene una función de anticuerpo conocida, pero puede servir como un receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media la hipersensibilidad inmediata al causar la liberación de mediadores de los mastocitos y basófilos tras exponerse al alérgeno.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "material de formación" incluye una publicación, un registro, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que se pueda utilizar para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material de formación del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o puede enviarse junto con un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Como alternativa, el material de formación puede enviarse por separado del recipiente con la intención de que el material de formación y el compuesto se utilicen cooperativamente por el receptor.

"Aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido naturalmente presente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o proteína aislada puede existir en forma sustancialmente purificada o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, es decir, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que normalmente son adyacentes al fragmento, es decir, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que ocurre naturalmente. El término también se aplica a los ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente de otros componentes que naturalmente acompañan al ácido nucleico, es decir, ARN o ADN o proteínas, que naturalmente lo acompañan en la célula. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (es decir, como un ADNc o un fragmento de ADNc genómico producido mediante PCR o digestión con enzimas de restricción), independiente de otras

secuencias. También incluye un ADN recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

En el ámbito de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que ocurren comúnmente. "A" se refiere a adenosina. "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina, y "U" se refiere a uridina.

Salvo que se especifique otra cosa, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener en alguna versión un intrón(es).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "modular" pretende referirse a cualquier cambio en el estado biológico, es decir, que aumenta, disminuye y similares.

La expresión "unido operativamente" se refiere al enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, donde sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, en el mismo marco de lectura.

La administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, por ejemplo, inyección subcutánea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), o intraesternal, o técnicas de infusión.

El término "polinucleótido" como se utiliza en el presente documento se define como una cadena de nucleótidos. Adicionalmente, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos y polinucleótidos, como se utilizan en el presente documento, son intercambiables. Un experto en la materia tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se utiliza en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen mediante cualquier medio disponible en la materia, incluyendo, sin limitación, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando tecnología de clonación ordinaria y PCR™, y similares, y mediante medios sintéticos.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido", y "proteína" se utilizan indistintamente, y se refieren a un compuesto compuesto por restos de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se establece ninguna limitación sobre el número máximo de aminoácidos que pueden comprender una secuencia de proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término se refiere tanto a las cadenas cortas, que también comúnmente se conocen en la materia como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a las cadenas más largas, que en general se denominan en la materia proteínas, de las cuales existen muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos, o una combinación de los mismos.

El término "promotor" como se utiliza en el presente documento se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o la maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de una secuencia polinucleotídica.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "secuencia promotora/reguladora" significa 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 exprese el producto génico de una manera específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula en la mayoría o en todas las condiciones fisiológicas de la célula.

Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula

de manera sustancial solo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente con un polinucleótido codificado o especificado por un gen, hace que el producto génico se produzca en una célula de manera sustancial solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

El término "ARN" como se utiliza en el presente documento se define como ácido ribonucleico.

El término "ADN recombinante", como se utiliza en el presente documento, se define como el ADN producido mediante la unión de fragmentos de ADN de diferentes fuentes.

El término "polipéptido recombinante" como se utiliza en el presente documento se define como un polipéptido producido mediante la utilización de métodos de ADN recombinante.

El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, mamíferos).

Tal como se utiliza en el presente documento, una célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que se ha separado de otros tipos de células con los que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a las células que se han separado de las células con las que están naturalmente asociadas en su estado natural. En algunas realizaciones, las células se cultivan *in vitro*. En otras realizaciones, las células no se cultivan *in vitro*.

El término "T colaborador" como se utiliza en el presente documento con referencia a células indica un subgrupo de linfocitos (un tipo de glóbulo blanco o leucocito) que incluye diferentes tipos de células identificables por una persona experta. En particular, los linfocitos T colaboradores de acuerdo con la presente divulgación incluyen linfocitos T_H efectores (tales como Th1, Th2 y Th17). Estos linfocitos Th secretan citocinas, proteínas o péptidos que estimulan o interactúan con otros leucocitos.

El término "terapéutico" como se utiliza en el presente documento significa un tratamiento y/o profilaxis. Un efecto terapéutico se obtiene mediante la supresión, remisión o erradicación de un estado de enfermedad.

El término "transfectado" o "transformado" o "transducido" como se utiliza en el presente documento se refiere a un proceso mediante el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o se introduce en la célula hospedadora. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que ha sido transfectada, transformada o transducida con un ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula del sujeto primario y su progenie.

La frase "bajo control transcripcional" o "unido operativamente" como se utiliza en el presente documento significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción mediante la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

"Variante" como se utiliza el término en el presente documento, es una secuencia de ácido nucleico o una secuencia peptídica que difiere en secuencia de una secuencia de ácido nucleico o secuencia peptídica de referencia respectivamente, pero retiene propiedades esenciales de la molécula de referencia. Los cambios en la secuencia de una variante de ácido nucleico no pueden alterar la secuencia de aminoácidos de un péptido codificado por el ácido nucleico de referencia, o pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, eliminaciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos. Los cambios en la secuencia de variantes de péptidos son normalmente limitados o conservativos, de modo que las secuencias del péptido de referencia y la variante son muy similares en general y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un péptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones en cualquier combinación. Una variante de un ácido nucleico o péptido puede ser de origen natural, como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe que ocurra de forma natural. Las variantes de origen no natural de ácidos nucleicos y péptidos pueden hacerse mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede utilizar para suministrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la materia que incluyen, pero sin limitación a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término "vector" incluye un plásmido que se replica de forma autónoma o un virus. También se debe interpretar que el término incluye compuestos no plásmidos y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales y similares.

Por el término "estimulación", se entiende una respuesta primaria inducida mediante la unión de una molécula estimuladora (por ejemplo, un complejo TCR/CD3) con su ligando afín, mediando así un evento de transducción de

señales, tal como, pero sin limitación a, la transducción de señales a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, como la regulación a la baja de TGF- β , y/o la reorganización de las estructuras del citoesqueleto, y similares.

- 5 "Activación", como se utiliza en el presente documento, se refiere al estado de un linfocito T que ha sido suficientemente estimulado para inducir la proliferación celular detectable. La activación también puede estar asociada con la producción inducida de citocinas y funciones efectoras detectables. La expresión "linfocitos T activados" se refiere a, entre otras cosas, los linfocitos T que están en proceso de división celular.
- 10 Por la expresión "se une específicamente", como se utiliza en el presente documento, se entiende un anticuerpo, o un ligando, que reconoce y se une con una proteína compañera de unión afín (por ejemplo, una molécula estimuladora y/o coestimuladora presente en un linfocito T) presente en una muestra, pero cuyo anticuerpo o ligando no reconoce o une sustancialmente otras moléculas en la muestra.
- 15 Un "ligando estimulador", como se utiliza en el presente documento, significa un ligando que cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, un linfocito B, y similares) se puede unir específicamente con un compañero de unión afín (referido al presente documento como una "molécula estimuladora") en un linfocito T, mediando así una respuesta primaria por parte del linfocito T, incluyendo, pero sin limitación a, activación, iniciación de una respuesta inmunitaria, proliferación y similares. Los ligandos estimuladores
- 20 son bien conocidos en la materia y abarcan, entre otros, una molécula de MHC Clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo superagonista anti-CD28 y un anticuerpo superagonista anti-CD2.

Una "molécula estimuladora", como se utiliza el término en el presente documento, significa una molécula en un linfocito T que se une específicamente con un ligando estimulador afín presente en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC de la invención, entre otros).

"Cargado" con un péptido, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la presentación de un antígeno en el contexto de una molécula de MHC. "Cargado" como se utiliza en el presente documento también significa la unión de un anticuerpo a un receptor de unión a Fc en una célula, tal como CD32 y/o CD64.

30 Una "señal coestimuladora", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una señal, que en combinación con una señal primaria, como la ligadura de TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o la regulación positiva o negativa de las moléculas clave.

35 Una "molécula coestimuladora" se refiere a la pareja de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando así una respuesta coestimuladora por parte del linfocito T, tal como, pero sin limitación a, la proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, una molécula de MHC de clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll.

40 "Ligando coestimulador", como se utiliza el término en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, un linfocito B y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora afín en un linfocito T, proporcionando así una señal que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula de MHC cargada con péptido, media una respuesta de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitación a, proliferación, activación, diferenciación, y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, aunque no de forma limitativa, 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 del ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se une

45 específicamente con una molécula coestimuladora presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitación a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83.

Descripción

55 La presente invención se basa en parte en la observación de que la naturaleza de la coestimulación durante la activación de los linfocitos T CD4⁺ regula fundamentalmente la diferenciación de linfocitos Th17 humanos. Por ejemplo, se encontró que ICOS, pero no CD28, era necesario para la expansión y función óptimas de linfocitos Th17 humanos. De manera sorprendente, la ligadura de CD28 anuló los efectos de la coestimulación con ICOS. De relevancia clínica, los linfocitos Th17 humanos reprogramados genéticamente se expandieron con regresión superior

60 de tumores humanos mediada por ICOS en comparación con las células expandidas con CD28. Estos hallazgos revelan un papel clave para la señalización de ICOS en el desarrollo de linfocitos Th17 humanos y sugieren nuevos enfoques terapéuticos.

65 La invención se refiere al descubrimiento sorprendente de que la coestimulación con ICOS de linfocitos Th17 dio como resultado niveles significativamente más altos de producción de IL-17F, CCL20 e IL-21 en comparación con

los niveles de IL-17F, CCL20 e IL-21 producidos a partir de una célula por lo demás idéntica coestimulada con CD28. En algunos casos, la coestimulación con ICOS también dio como resultado una secreción elevada de IL-17A en comparación con el nivel de secreción de IL-17A de una célula por lo demás idéntica coestimulada con CD28. En algunos casos, los linfocitos Th17 estimulados con ICOS también produjeron cantidades sustancialmente mayores de IFN γ en comparación con los linfocitos Th1 estimulados con CD28, un subconjunto que antes se consideraba una fuente dominante de producción de IFN γ .

Por consiguiente, la presente invención incluye composiciones y métodos para generar una población de linfocitos Th17 humanos que tienen características inflamatorias únicas. Por ejemplo, los linfocitos Th17 estimulados con ICOS secretan altos niveles de IL-17 y CCL20, así como producen niveles elevados de IFN γ e IL-21 en comparación con los linfocitos Th1 estimulados con CD28. La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que la coestimulación con ICOS, pero no con CD28, expande preferentemente los linfocitos Th17. La coestimulación con ICOS proporciona un medio para cultivar la expansión de Th17 y mantener el cultivo a largo plazo de los linfocitos Th17.

La presente invención proporciona composiciones y métodos para su uso para expandir linfocitos Th17, así como numerosos usos terapéuticos relacionados con la expansión y estimulación de linfocitos Th17.

También se desvelan composiciones y métodos para generar cantidades terapéuticas de linfocitos Th17 a partir de sangre del cordón umbilical (UCB, Umbilical Cord Blood) o periférica. En algunos casos, los linfocitos Th17 se generan a partir de células precursoras indiferenciadas. Preferentemente, las células precursoras indiferenciadas son células CD45RA+CD25.

Composición

La invención se refiere a composiciones que comprenden un agente que proporciona una señal coestimuladora a un linfocito T para la expansión de linfocitos T (por ejemplo, ICOSL). En algunos casos, la señal coestimuladora se proporciona a un linfocito T en combinación con un agente que proporciona una señal de activación primaria al linfocito T (por ejemplo, un complejo TCR/CD3). Por ejemplo, un agente que proporciona una señal de activación primaria al linfocito T es un anticuerpo anti-CD3.

En algunos casos, el agente (primario, coestimulador o combinación de los mismos) se une preferentemente a perlas. Las composiciones de la invención también pueden incluir aquellas que comprenden más de un tipo de agente acoplado a diferentes superficies en fase sólida (es decir, un agente que proporciona una señal de activación de linfocitos T primaria acoplada a una primera superficie en fase sólida y un agente que proporciona una señal coestimuladora acoplada a una segunda superficie en fase sólida).

Como alternativa, el agente (primario, coestimulador, o combinación de los mismos) está en el contexto de mostrarse en una célula presentadora de antígeno artificial (aAPC). Por consiguiente, la invención incluye cualquier medio para promover el compromiso con ICOS de los linfocitos T utilizando una superficie en fase sólida (por ejemplo, perlas) o una célula (por ejemplo, aAPC). Es decir, existe un amplio conocimiento en la materia con respecto a los acontecimientos y las moléculas involucradas en la activación e inducción de linfocitos T. Sin embargo, la invención se basa en el descubrimiento inesperado de que el compromiso de ICOS, pero no la coestimulación con CD28, expande preferentemente células que tienen un fenotipo Th17. El solicitante hace referencia a la amplia divulgación proporcionada en los documentos WO 03/057171 y US2003/0147869. Más específicamente, una señal primaria, generalmente mediada a través del complejo receptor de linfocitos T/CD3 en un linfocito T, inicia el proceso de activación del linfocito T. Adicionalmente, numerosas moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de un linfocito T están implicadas en la regulación de la transición del linfocito T en reposo a la proliferación celular. Dichas moléculas coestimuladoras, también denominadas "coestimuladores", que se unen específicamente con sus respectivos ligandos, incluyen, pero no se limitan a, CD28 (que se une con B7-1 [CD80], B7-2 [CD86], PD-1 (que se une con los ligando 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 lo tanto, la señal estimuladora primaria media la estimulación de linfocitos T, pero la señal coestimuladora se requiere luego para la activación de linfocitos T, como lo demuestra la proliferación.

La activación de linfocitos T se puede lograr mediante la estimulación del complejo TCR/CD3 de linfocitos T o a través de la estimulación de la proteína de superficie CD2. Se puede utilizar un anticuerpo monoclonal anti-CD3 para activar una población de linfocitos T a través del complejo TCR/CD3. Aunque varios anticuerpos monoclonales anti-CD3 humanos están disponibles comercialmente, se prefiere el OKT3 preparado a partir de células de hibridoma obtenidas de la American Type Culture Collection o el anticuerpo monoclonal G19-4. De forma similar, la unión de un anticuerpo anti-CD2 activará los linfocitos T. Las formas estimuladoras de anticuerpos anti-CD2 son conocidas y están disponibles.

También se puede suministrar una señal de activación primaria a un linfocito T mediante el uso de una combinación de un activador de proteína quinasa C (PKC, Protein Kinase C) como un éster de forbol (por ejemplo, acetato de miristato de forbol) y un ionóforo de calcio (por ejemplo, ionomicina que eleva las concentraciones de calcio

citoplásmico). El uso de estos agentes pasa por alto el complejo TCR/CD3 pero suministra una señal estimuladora a los linfocitos T. También se sabe que estos agentes ejercen un efecto sinérgico sobre los linfocitos T para promover la activación de los linfocitos T y se pueden utilizar en ausencia de antígeno para suministrar una señal de activación primaria a los linfocitos T.

5 Aunque la estimulación del complejo TCR/CD3 o la molécula CD2 es necesaria para el suministro de una señal de activación primaria en un linfocito T, varias moléculas en la superficie de los linfocitos T, denominadas moléculas accesorias o coestimuladoras, han sido implicadas en la regulación de la transición de un linfocito T en reposo a la transformación linfoblástica y la proliferación y diferenciación subsiguientes. Por lo tanto, además de la señal de
10 activación primaria proporcionada a través del complejo TCR/CD3, la inducción de respuestas de linfocitos T requiere una segunda señal coestimuladora. Se cree que dicha molécula coestimuladora o accesorio, CD28, inicia o regula una vía de transducción de señales que es distinta de las estimuladas por el complejo TCR. Sin embargo, la invención se basa en el descubrimiento de que ICOS, pero no la coestimulación con CD28, expande preferentemente células que tienen un fenotipo Th17. Además, la coestimulación combinada con CD28 e ICOS no
15 potencia, sino que reduce específicamente el fenotipo Th17. Este descubrimiento fue sorprendente debido al uso extensivo de CD28 en la materia para expandir Th17.

Por consiguiente, la invención se refiere al uso de composiciones que pueden promover la coestimulación con ICOS en linfocitos T. La invención abarca cualquier agente que pueda inducir la estimulación de la molécula ICOS.
20 Además, también se pueden utilizar homólogos de unión de un ligando natural, ya sea nativo o sintetizado mediante técnica química o recombinante, de acuerdo con la invención. Los ligandos útiles para estimular un ICOS se pueden utilizar en forma soluble, unidos a la superficie de una célula, o inmovilizados en una *superficie* en fase sólida como se describe en el presente documento. Los anticuerpos anti-ICOS o fragmentos de los mismos también son útiles en la estimulación de la molécula de ICOS.

25 En una realización específica de la invención, los linfocitos T activados se ponen en contacto con una forma estimuladora de un ligando natural para ICOS para la coestimulación. El ligando natural de ICOS se denomina en la materia ICOSL. Una "forma estimuladora de un ligando natural para ICOS" es una forma de un ligando natural que es capaz de unirse a ICOS y coestimular el linfocito T. La coestimulación se puede evidenciar mediante la
30 proliferación y/o la producción de citocinas mediante los linfocitos T que han recibido una señal de activación primaria, tal como la estimulación a través del complejo CD3/TCR o a través de CD2.

En una realización preferida de la invención, una molécula de ICOSL está localizada en la superficie de una célula. Esto puede lograrse mediante la transfección de una célula con un ácido nucleico que codifica la molécula de ICOSL en una forma adecuada para su expresión en la superficie de la célula o alternativamente mediante el acoplamiento
35 de una molécula de ICOSL a la superficie celular. Como alternativa, un anticuerpo anti-ICOS puede ser "cargado" a la superficie celular de una aAPC. Es decir, el experto en la materia entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que una aAPC que comprende un anticuerpo se puede producir, como se ejemplifica en cualquier otro lugar del presente documento, mediante la introducción de un ácido nucleico que
40 codifica un receptor Fcγ humano (por ejemplo, CD32 o CD64), en la aAPC. El CD32 y/o CD64 expresados en la superficie de aAPC se pueden luego "cargar" con cualquier anticuerpo deseado que se una con CD32 y/o CD64, incluyendo, pero sin limitación a, el anticuerpo que se une específicamente a CD3 y el anticuerpo que se une específicamente con ICOS.

45 Un experto habitual en la materia reconocerá que cualquier agente, incluido un anticuerpo anti-ICOS o fragmento del mismo capaz de reticular la molécula ICOS, o un ligando natural para ICOS se puede utilizar para estimular los linfocitos T. En particular, el ligando de ICOS humano se puede clonar a partir de la célula apropiada en el pcDNA3 u otros vectores adecuados y se puede transfectar en una aAPC.

50 Además, la invención abarca una aAPC donde un ácido nucleico que codifica el ligando de anticuerpo de interés, opcionalmente unido a una secuencia IRES, se transduce y expresa en la superficie de la aAPC, eliminando así la necesidad de expresión de CD32 y/o CD64 y la carga de la misma. Por lo tanto, la presente invención incluye una aAPC transducida con un ácido nucleico que codifica al menos un anticuerpo que se une específicamente con una molécula asociada con una señal de activación primaria e ICOS, entre otros, así como una aAPC transducida con
55 CD32 y/o CD64 y cargada con al menos un anticuerpo que se une específicamente con las moléculas antes mencionadas.

Formas solubles de ICOSL como coestimulador

60 Los ligandos naturales de ICOS también se pueden presentar a los linfocitos T en forma soluble. Las formas solubles de las moléculas de ICOSL incluyen moléculas de ICOSL naturales, un fragmento de las mismas, o una forma modificada de la longitud completa o fragmento de la molécula de ICOSL que es capaz de unirse a ICOS y coestimular el linfocito T. La coestimulación se puede evidenciar mediante la proliferación y/o la producción de citocinas mediante los linfocitos T que han recibido una señal de activación primaria. Las modificaciones de las
65 moléculas de ICOSL incluyen modificaciones que preferentemente mejoran la afinidad de unión de las moléculas de ICOSL a las moléculas ICOS, pero también modificaciones que disminuyen o no afectan la afinidad de unión de las

moléculas de ICOSL a las moléculas ICOS. Las modificaciones de las moléculas de ICOSL también incluyen aquellas que aumentan la estabilidad de una forma soluble de una molécula de ICOSL. Las modificaciones de las moléculas ICOS se producen generalmente mediante sustituciones de aminoácidos, pero también se pueden producir mediante enlace a otra molécula.

- 5 En una realización específica, la forma soluble de una molécula de ICOSL es una proteína de fusión que contiene un primer péptido que consiste en una molécula de ICOSL, o fragmento de la misma y un segundo péptido correspondiente a una fracción que altera la solubilidad, unión, afinidad, estabilidad o valencia (es decir, el número de sitios de unión disponibles por molécula) del primer péptido. Preferentemente, el primer péptido incluye una
- 10 porción de dominio extracelular de una molécula de ICOSL que interactúa con ICOS y es capaz de proporcionar una señal coestimuladora como lo demuestra mediante la estimulación de la proliferación de linfocitos T o la secreción de citocinas de los linfocitos T tras la exposición a la proteína de fusión ICOSL y una señal de activación de linfocitos T primaria.
- 15 Las proteínas de fusión dentro del alcance de la invención se pueden preparar mediante la expresión de un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión en una variedad de sistemas diferentes. Normalmente, el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión ICOSL comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica un primer péptido que consiste en una molécula de ICOSL o un fragmento de la misma y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo péptido correspondiente a una fracción que altera la solubilidad, unión,
- 20 estabilidad, o valencia del primer péptido, tal como una región constante de inmunoglobulina. El ácido nucleico que codifica un péptido que comprende una región constante de inmunoglobulina se puede obtener a partir del ARNm de inmunoglobulina humana presente en los linfocitos B. También es posible obtener ácido nucleico que codifica una región constante de inmunoglobulina a partir de ADN genómico de linfocitos B, por ejemplo, el ADN que codifica Cy1 o Cy4 se puede clonar a partir de un ADNc o una biblioteca genómica o mediante amplificación de la reacción en
- 25 cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con los protocolos estándar. Un ácido nucleico preferido que codifica una región constante de inmunoglobulina comprende todo o una parte de lo siguiente; el ADN que codifica Cy1 humano (Takahashi, N. S. et al. (1982) Cell 29:671-679), el ADN que codifica Cy2 humano; el ADN que codifica Cy3 humano (Huck, S., et al. (1986) Nucl. Acid Res. 14:1779); y el ADN que codifica Cy4 humano. Cuando se utiliza una región constante de inmunoglobulina en la proteína de fusión ICOSL, la región constante se puede modificar para reducir al
- 30 menos una función efectora biológica mediada por la región constante, por ejemplo, el ADN que codifica una región constante Cy1 o Cy4 se puede modificar mediante mutagénesis PCR o mutagénesis dirigida al sitio. Los protocolos y reactivos para sistemas de mutagénesis dirigida al sitio se pueden obtener comercialmente de Amersham International PLC, Amersham, Reino Unido.
- 35 En una realización, la primera y la segunda secuencia de nucleótidos están unidas (es decir, en una orientación 5' a 3' mediante enlaces fosfodiéster) de manera que el marco de traducción de la proteína ICOSL o fragmento de la misma y la IgC (es decir, el fragmento Fc que comprende la bisagra, las regiones CH2 y CH3 de IgG humana) que codifica los segmentos, se mantienen (es decir, las secuencias de nucleótidos se unen entre sí en el marco). Por lo tanto, la expresión (es decir, la transcripción y la traducción) de la secuencia de nucleótidos produce una proteína de
- 40 fusión ICOSLIg funcional. Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, una proteína de fusión ICOSLIg se puede construir utilizando ADN de plantilla separados que codifican ICOSL y una región constante de inmunoglobulina. Los segmentos apropiados de cada ADN de plantilla se pueden amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ligarse en marco utilizando técnicas estándar. Un ácido nucleico de la invención también se puede sintetizar químicamente utilizando
- 45 técnicas estándar. Se conocen varios métodos para sintetizar químicamente polidesoxinucleótidos, incluido la síntesis en fase sólida que se ha automatizado en sintetizadores de ADN disponibles comercialmente (Véase, por ejemplo, Itakura et al. Patente de EE.UU. n.º 4.598.049; Caruthers et al. Patente de EE.UU. n.º 4.458.066; e Itakura Patentes de EE.UU. n.º 4.401.796 y 4.373.071).
- 50 La siguiente es una descripción de las técnicas de biología molecular aplicables para generar ICOSL soluble. Sin embargo, estas técnicas de biología molecular se pueden aplicar para generar ICOSL presentada en el contexto de cualquier forma abarcada por la presente invención (por ejemplo, presentada en un soporte de fase sólida, una aAPC, y similares).
- 55 Los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de ICOSL o las proteínas de fusión ICOSLIg se pueden insertar en diversos vectores de expresión, que a su vez dirigen la síntesis de la proteína correspondiente en una variedad de hospedadores, particularmente células eucariotas, como el cultivo de células de mamíferos o insectos y células procariotas, tal como *E. coli*. Los vectores de expresión dentro del alcance de la invención comprenden un ácido nucleico como se describe en el presente documento y un promotor unido operativamente al ácido nucleico. Dichos
- 60 vectores de expresión se pueden utilizar para transfectar células hospedadoras para producir de este modo proteínas de fusión codificadas mediante ácidos nucleicos como se describe en el presente documento. Un vector de expresión de la invención, tal como se describe en el presente documento, incluye normalmente secuencias de nucleótidos que codifican una molécula de ICOSL o proteína de fusión ICOSLIg unida operativamente a al menos una secuencia reguladora.
- 65 Un vector de expresión de la invención se puede utilizar para transfectar células, procariotas o eucariotas (por ejemplo, células de mamíferos, insectos o levaduras) para producir de este modo proteínas de fusión codificadas

mediante secuencias de nucleótidos del vector. La expresión en procariotas se lleva a cabo con mayor frecuencia en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles. Ciertos vectores de expresión de *E. coli* (los denominados vectores de fusión) están diseñados para agregar una cantidad de restos de aminoácidos a la proteína recombinante expresada, generalmente al extremo amino de la proteína expresada. Dichos vectores de fusión sirven normalmente para tres fines; 1) para aumentar la expresión de la proteína recombinante; 2) para aumentar la solubilidad de la proteína recombinante diana; y 3) para ayudar en la purificación de la proteína recombinante diana actuando como un ligando en la purificación por afinidad. Los ejemplos de vectores de expresión de fusión incluyen pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia) y pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) que fusionan la proteína de unión glutatión S-transferasa y maltosa E, respectivamente, a la proteína recombinante diana. Por consiguiente, una molécula de ICOSL o un gen de fusión de ICOSLlg puede unirse a secuencias codificantes adicionales en un vector de fusión procariota para ayudar en la expresión, solubilidad o purificación de la proteína de fusión. A menudo, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión de la fracción de fusión y la proteína recombinante diana para permitir la separación de la proteína recombinante diana procedente de la fracción de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el factor Xa, trombina y enterocinasas.

Una estrategia para maximizar la expresión de una molécula de ICOSL o proteína de fusión ICOSLlg en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria hospedadora con una capacidad disminuida para escindir proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press. San Diego, Calif. (1990) 119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de nucleótidos de la molécula de ICOSL o la construcción de la proteína de fusión ICOSLlg para que se inserte en un vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en proteínas de *E. coli* altamente expresadas (Wada et al., (1992) Nuc. Acids Res. 20:2111-2118). Dicha alteración de las secuencias de ácido nucleico está abarcada por la invención y se puede llevar a cabo utilizando técnicas de síntesis de ADN estándar.

Como alternativa, una molécula de ICOSL o una proteína de fusión ICOSLlg se puede expresar en una célula hospedadora eucariota, tal como células de mamíferos (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) o células NS0), células de insecto (por ejemplo, utilizando un vector de baculovirus) o células de levadura. Los expertos en la materia conocen otras células hospedadoras adecuadas. La expresión eucariota, en lugar de procariota, de una molécula de ICOSL o proteína de fusión ICOSLlg puede ser preferible ya que la expresión de proteínas eucariotas en células eucariotas puede conducir a una glucosilación parcial o completa y/o a la formación de enlaces disulfuro inter o intracadena relevantes de una proteína recombinante. Para la expresión en células de mamíferos, las funciones de control del vector de expresión a menudo son proporcionadas mediante material viral.

El vector de ADN se puede introducir en células procariotas o eucariotas a través de técnicas convencionales de transformación o transfección, tales como la co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación. Se pueden encontrar métodos adecuados para transformar células hospedadoras en Sambrook et al (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (2001)), y otros libros de texto de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizados, solo una pequeña fracción de células puede integrar ADN en sus genomas. A fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) se introduce generalmente en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula hospedadora en el mismo plásmido que el gen de interés o puede introducirse en un plásmido separado. Las células que contienen el gen de interés se pueden identificar mediante la selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán). Las células supervivientes se pueden seleccionar para determinar la producción de moléculas de ICOSL o proteínas de fusión ICOSLlg mediante, por ejemplo, inmunoprecipitación del sobrenadante celular con un anticuerpo monoclonal anti-ICOSL.

La molécula de ICOSL o las proteínas de fusión ICOSLlg producidas mediante una técnica recombinante pueden secretarse y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene la proteína. Como alternativa, la proteína se puede retener citoplásmicamente y las células se pueden recoger, lisar y la proteína aislar. Un cultivo celular normalmente incluye células hospedadoras, medios y otros subproductos. Los medios adecuados para el cultivo celular son bien conocidos en la materia. La proteína se puede aislar del medio de cultivo celular, de las células hospedadoras, o de ambas utilizando técnicas conocidas en la materia para purificar proteínas.

Para la coestimulación de linfocitos T, la forma soluble del ligando natural para ICOSL se agrega al cultivo de linfocitos T en una cantidad suficiente para dar como resultado la coestimulación de linfocitos T activados. La cantidad apropiada de ligando soluble que se agregará variará con el ligando específico, pero se puede determinar mediante el ensayo de diferentes cantidades del ligando soluble en cultivos de linfocitos T y mediante la medición del grado de coestimulación mediante ensayos de proliferación o producción de citocinas, como se describe en los Ejemplos.

Acoplamiento de los ligandos naturales a una superficie en fase sólida

En otra realización de la invención, se puede presentar un ligando natural de ICOS a los linfocitos T en una forma unida a una superficie en fase sólida, tal como perlas. Las moléculas de ICOSL, fragmentos de las mismas o formas modificadas de las mismas capaces de unirse a ICOS y coestimular los linfocitos T se pueden preparar como se describe para las formas de ICOST solubles. Estas moléculas se pueden unir luego a la superficie de la fase sólida a través de varios métodos. Por ejemplo, las moléculas de ICOSL se pueden reticular con las perlas a través de la modificación covalente utilizando el enlace tosilo. En este método, las moléculas de ICOSL o las proteínas de fusión ICOSL están en tampón de borato 0,05 M, pH 9,5 y se pueden agregar a inmunoperlas magnéticas activadas por tosilo (Dynal Inc., Great Neck, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de una incubación de 24 horas a 22 °C, las perlas se recogen y se lavan extensamente. No es obligatorio que se usen perlas inmunomagnéticas, ya que otros métodos también son satisfactorios. Por ejemplo, las moléculas de ICOSL también pueden inmovilizarse sobre perlas de poliestireno o superficies de vasos de cultivo. La unión covalente de las moléculas de ICOSL o proteínas de fusión ICOSLg a la superficie en fase sólida es preferible a la adsorción o captura por un anticuerpo monoclonal secundario. Las proteínas de fusión ICOSLg se pueden unir a la superficie en fase sólida a través de moléculas de anti-IgG humana unidas a la superficie en fase sólida. Estas perlas se pueden incubar luego con las proteínas de fusión ICOSLg en un tampón apropiado como PBS durante aproximadamente una hora a 5 °C, y las proteínas ICOSLg no acopladas se eliminan mediante el lavado de las perlas en un tampón, tal como PBS.

También es posible unir las moléculas de ICOSL a la superficie en fase sólida a través de un complejo de avidina o estreptavidina-biotina. En esta realización particular, la molécula de ICOSL soluble se reticula primero con biotina y luego se hace reaccionar con la superficie en fase sólida a la que se unen las moléculas de avidina o estreptavidina. También es posible reticular las moléculas de ICOSL con avidina o estreptavidina y hacer reaccionar con una superficie en fase sólida que está recubierta con moléculas de biotina.

La cantidad de moléculas de ICOSL unidas a la superficie en fase sólida se puede determinar mediante análisis FACS si la superficie en fase sólida es la de las perlas o mediante ELISA si la superficie en fase sólida es la de una placa de cultivo de tejidos. Los anticuerpos reactivos con las moléculas de ICOSL se pueden utilizar en estos ensayos.

En una realización específica, la forma estimuladora de una molécula de ICOSL está unida a la misma superficie en fase sólida que el agente que estimula el complejo TCR/CD3, tal como un anticuerpo anti-CD3. Además del anti-CD3, se pueden utilizar otros anticuerpos que se unen a receptores que imitan señales de antígeno, por ejemplo, las perlas u otra superficie en fase sólida pueden recubrirse con combinaciones de anti-CD2 y una molécula de ICOSL.

En un experimento típico, las perlas recubiertas con ICOSL o las perlas recubiertas con moléculas de ICOSL y un agente que estimula el complejo TCR/CD3 se agregarán en una proporción de 3 perlas por linfocito T. Sin embargo, la relación se puede ajustar para proporcionar un resultado deseable.

Célula presentadora de antígeno artificial (aAPC)

La invención abarca una aAPC donde el ligando coestimulador es un compañero de unión afín que se une específicamente con una molécula coestimuladora, así como donde el ligando es un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora, y cualquier combinación de las mismas, de manera que una sola aAPC puede comprender tanto ácidos nucleicos que codifican ligandos coestimuladores como anticuerpos específicos para moléculas coestimuladoras presentes en el linfocito T, y cualquier combinación de los mismos. El solicitante hace referencia a la extensa divulgación con respecto a las aAPC proporcionadas en los documentos WO 03/057171 y US2003/0147869.

Sin embargo, la presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que la coestimulación con ICOS en lugar de la coestimulación con CD28 expande preferentemente células con un fenotipo Th17.

La invención también abarca una aAPC que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Se incluye una gran cantidad de antígenos, tales como, pero sin limitación a, antígenos tumorales, por ejemplo, telomerasa, antígeno de melanoma reconocido por los linfocitos T (MART-1), genes que codifican el antígeno del melanoma, 1, 2 y 3 (MAGE-1, -2, -3), melanoma GP100, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer de mama HER-2/Neu, antígeno específico de suero de la próstata (PSA), Tumor de Wilm 1 (WT-1), antígenos de mucina (MUC-1, -2, -3, -4) e idiotipos de linfoma de linfocitos B. Esto se debe a que, como lo demuestran los datos desvelados en otra parte del presente documento, una aAPC basada en K562 que comprende un antígeno, puede procesar y presentar el antígeno en el contexto de MHC (donde el linfocito También se transduce con un ácido nucleico que codifica una molécula MHC de clase I o clase II) produciendo así linfocitos T específicos de antígeno y expandiendo una población de los mismos. Los datos desvelados demuestran que los linfocitos T se expandieron con perlas anti-CD3/ICOS o anti-CD3/ICOSL que expresan aAPC, y luego se modificaron genéticamente con un inmunorreceptor quimérico para conferir especificidad para los tumores que expresan mesotelina y mostraron

actividad antitumoral. Por lo tanto, se pueden utilizar aAPC para expandir y producir suficientes linfocitos T específicos de antígeno para administrar los linfocitos T a un paciente que lo necesite, proporcionando así un tratamiento inmunovacínico dirigido contra células tumorales que llevan el antígeno. Como alternativa, las aAPC se pueden administrar directamente al paciente como otra forma de inmunovacunación. Por lo tanto, se puede introducir un antígeno de interés en una aAPC de la invención, donde la aAPC luego presenta el antígeno en el contexto del complejo MCH de Clase I o II, es decir, la molécula MHC está "cargada" con el antígeno, y la aAPC se puede utilizar para producir un linfocito T específico de antígeno. Como alternativa, la aAPC se puede utilizar para expandir los linfocitos T *in vitro* o *in vivo*, y el linfocito T expandido se puede modificar adicionalmente para volverse específico de antígeno.

En una realización, la invención incluye un linfocito T que se ha expandido con al menos mediante la estimulación con ICOS y el linfocito T expandido se modifica adicionalmente para hacer que el antígeno de linfocito T coestimulado con ICOS sea específico. Por ejemplo, un linfocito T coestimulado con ICOS puede volverse específico de Ag *in vitro*, por ejemplo, modificado genéticamente con el linfocito T coestimulado con ICOS para conferir especificidad para un antígeno deseado. El linfocito T coestimulado con ICOS puede transfectarse con un vector que permite la expresión de un antígeno específico mediante el linfocito T coestimulado con ICOS.

En otra realización, la invención utiliza ICOSL aAPC para estimular los linfocitos T *in vivo*. Los linfocitos T pueden haber sido diseñados previamente *in vitro* y después de la infusión a un paciente, potenciados con la vacuna ICOSL aAPC. Como alternativa, la ICOSL aAPC puede cargarse con antígenos y utilizarse como una vacuna previa para estimular una respuesta Th17.

Como se discute en otra parte del presente documento, los vectores pueden prepararse para incluir un polinucleótido específico que codifica y expresa una proteína a la que se desea una respuesta inmunogénica. Como se discute en otra parte del presente documento, se pueden utilizar varios métodos para transfectar un polinucleótido en una célula hospedadora. Los métodos incluyen, pero no se limitan a, precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, sistemas de dispersión coloidal (es decir, complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas).

Un polinucleótido que codifica un antígeno se puede clonar en un vector de expresión y el vector se puede introducir en un linfocito T estimulado con ICOS para generar de otro modo un linfocito T específico de antígeno estimulado con ICOS. Varios tipos de vectores y métodos para introducir ácidos nucleicos en una célula se discuten en otra parte del presente documento. Por ejemplo, un vector que codifica un antígeno puede introducirse en una célula hospedadora mediante cualquier método en la materia. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir a una célula hospedadora por medios físicos, químicos o biológicos. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), y en Ausubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).

El antígeno de interés puede proceder de un virus, un hongo o una bacteria. El antígeno puede ser un autoantígeno o un antígeno asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad infecciosa, un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria.

En determinadas realizaciones, se puede promover una respuesta inmunitaria mediante la introducción del linfocito T específico de antígeno coestimulado con ICOS en un mamífero. Para que una composición antigénica sea útil como vacuna, la composición antigénica debe inducir una respuesta inmunitaria al antígeno en una célula, tejido o mamífero (por ejemplo, un ser humano). Tal como se utiliza en el presente documento, una "composición inmunológica" puede comprender un antígeno (por ejemplo, un péptido o polipéptido), un ácido nucleico que codifica un antígeno (por ejemplo, un vector de expresión de antígeno), una célula que expresa o presenta un antígeno o componente celular. En realizaciones particulares, la composición antigénica comprende o codifica todo o parte de cualquier antígeno descrito en el presente documento, o un equivalente inmunológicamente funcional del mismo.

En el ámbito de la presente invención, "antígeno tumoral" o "antígeno de trastorno hiperproliferativo" o "antígeno asociado con un trastorno hiperproliferativo" se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos. En determinados aspectos, los antígenos de trastorno hiperproliferativo de la presente invención proceden de cánceres que incluyen, pero no se limitan a, melanoma primario o metastático, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer de cuello de útero, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y adenocarcinomas como cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y similares.

En una realización, el antígeno tumoral de la presente invención comprende uno o más epítomos de cáncer antigénicos inmunológicamente reconocidos por linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, Tumor Infiltrating Lymphocytes) procedentes de un tumor de cáncer de un mamífero.

Los tumores malignos expresan una serie de proteínas que pueden servir como antígenos diana para un ataque inmunológico. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan a, antígenos específicos de tejido, como MART-1,

tirosinasa y GP 100 en melanoma y fosfatasa ácida prostática (PAP, Prostatic Acid Phosphatase) y antígeno prostático específico (PSA, Prostate-Specific Antigen) en cáncer de próstata. Otras moléculas diana pertenecen al grupo de moléculas relacionadas con la transformación, como el oncogén HER-2/Neu/ErbB -2. Aún otro grupo de antígenos diana son antígenos onco-fetales tales como antígeno carcinoembrionario (CEA, CarcinoEmbryonic Antigen). En el linfoma de linfocitos B, la inmunoglobulina idiotipo específica del tumor constituye un antígeno de inmunoglobulina específico del tumor que es único para el tumor individual. Los antígenos de diferenciación de linfocitos B, como CD19, CD20 y CD37, son otros candidatos para los antígenos diana en el linfoma de linfocitos B. Algunos de estos antígenos (CEA, HER-2, CD 19, CD20, idiotipo) se han utilizado como dianas para la inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales con éxito limitado.

El antígeno tumoral y los epítomos antigénicos del cáncer del mismo pueden purificarse y aislarse a partir de fuentes naturales tales como aislados clínicos primarios, líneas celulares y similares. Los péptidos cancerígenos y sus epítomos antigénicos también pueden obtenerse mediante síntesis química o mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia. Las técnicas para la síntesis química se describen en Steward et al. (1969); Bodansky et al. (1976); Meienhofer (1983); y Schroder et al. (1965). Adicionalmente, como se describe en Renkvist et al. (2001), hay numerosos antígenos conocidos en la materia. Las siguientes tablas describen epítomos definidos por linfocitos T codificados por antígenos tumorales, y solo se enumeran aquellos antígenos tumorales reconocidos por linfocitos T (CD8+ citotóxicos o CD4+ colaboradores). Aunque los análogos o los epítomos modificados artificialmente no están enumerados, un experto en la materia reconoce cómo obtenerlos o generarlos por medios estándar en la materia. Otros antígenos, identificados por los anticuerpos y detectados por la tecnología Serex (véase Sahin et al. (1997) y Chen et al. (2000)), se identifican en la base de datos del Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer.

Fuentes de linfocitos T

Antes de la expansión, se obtiene una fuente de linfocitos T de un sujeto. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Los linfocitos T se pueden obtener de varias fuentes, incluidas las células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, tejido del bazo y tumores. En determinadas realizaciones de la presente invención, puede utilizarse cualquier número de líneas de linfocitos T disponibles en la materia. Los linfocitos T se pueden obtener a partir de una unidad de sangre extraída de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por los expertos en la materia, como la separación con ficoll. Las células de la sangre circulante de un individuo pueden obtenerse mediante aféresis o leucoféresis. El producto de la aféresis contiene normalmente linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos, y plaquetas. Las células recogidas mediante aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción plasmática y colocar las células en un tampón o medio apropiado para los pasos de procesamiento posteriores. Las células se pueden lavar con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Como alternativa, la solución de lavado puede carecer de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no de todos, los cationes divalentes. Tras el lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS libre de Ca, libre de Mg. Como alternativa, los componentes indeseables de la muestra de aféresis se pueden eliminar y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo.

Los linfocitos T pueden aislarse de la sangre periférica mediante el lisado de los glóbulos rojos y el agotamiento de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Como alternativa, los linfocitos T se pueden aislar del cordón umbilical, en cualquier caso, una subpoblación específica de linfocitos T se puede aislar adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa.

El enriquecimiento de una población de linfocitos T por selección negativa se puede lograr utilizando una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas negativamente. Un método preferido es la clasificación y/o selección de células a través de inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de la superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales incluye normalmente anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, y CD8.

Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, la concentración de las células y la superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas) puede variar. En determinadas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las perlas y las células se mezclan entre sí (es decir, aumentan la concentración de las células), para garantizar el máximo contacto de las células y las perlas. Por ejemplo, en una realización, se utiliza una concentración de 2 mil millones de células/ml. En una realización, se utiliza una concentración de mil millones de células/ml. En una realización adicional, se utiliza más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otra realización más, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. La utilización de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento del rendimiento celular, la activación celular y la expansión celular.

En una realización relacionada, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Mediante la dilución significativa de la mezcla de linfocitos T y la superficie (por ejemplo, partículas tales como perlas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona las células que expresan altas cantidades de antígenos deseados para unirse a las partículas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan más eficazmente que los linfocitos T CD8⁺ en concentraciones diluidas.

Los linfocitos T para la estimulación también se pueden congelar después de la etapa de lavado, lo que no requiere la etapa de eliminación de monocitos. Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, la etapa de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien muchas soluciones y parámetros de congelación son conocidos en la materia y serán útiles en este contexto, en un ejemplo no limitativo, un método implica el uso de PBS que contenga DMSO al 20 % y albúmina de suero humano al 8 %, u otros medios adecuados de congelación celular. Las células luego se congelan a -80 °C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos de congelación controlada, así como de congelación no controlada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido.

Estimulación de una población celular

Como se señala en el presente documento, la presente invención proporciona composiciones y métodos para estimular una población celular mediante fracciones de unión en las superficies de las células en esa población. Poner en contacto una población celular con un agente (por ejemplo, un ligando) que se une a una fracción de la superficie celular puede estimular la población celular. El ligando puede estar en solución pero también puede estar unido a una superficie. La ligadura de las fracciones de la superficie celular, como un receptor, generalmente puede inducir una vía de señalización particular.

Los métodos de la presente invención se refieren a la estimulación de una célula diana mediante la introducción de un ligando o agente que se une a una fracción celular, induciendo así un acontecimiento celular. La unión del ligando o agente a la célula puede desencadenar una vía de señalización que, a su vez, activa cambios fenotípicos o biológicos particulares en la célula. La estimulación de una célula diana mediante la introducción de un ligando o agente que se une a una fracción celular como se describe en el presente documento puede regular positivamente o regular negativamente cualquier número de procesos celulares que conduzcan a cambios fenotípicos o biológicos particulares en la célula.

La activación de la célula puede mejorar las funciones celulares normales o iniciar funciones celulares normales en una célula anormal. El método descrito en el presente documento proporciona estimulación mediante la puesta en contacto de las células con el ligando o agente que se une a una fracción de la superficie celular. La estimulación de una célula puede mejorarse o un acontecimiento celular particular puede estimularse mediante la introducción de un segundo agente o ligando que liga una segunda fracción de superficie celular. Este método puede aplicarse a cualquier célula para la cual la ligación de una fracción de la superficie celular conduce a un acontecimiento de señalización. La invención proporciona además medios para seleccionar o cultivar las células estimuladas.

En una divulgación, de acuerdo con la presente invención, las células de la sangre del cordón umbilical se estimulan en relación con la estimulación con ICOS. Por ejemplo, las células de la sangre del cordón umbilical se pueden estimular con perlas anti-CD3/anti-ICOS o con aAPC que expresan ICOSL, en presencia de citocinas de polarización Th17. Un ejemplo de citocinas de polarización Th17 incluyen, pero no se limitan a, las citocinas IL-6, IL-1β e IL-23 y los anticuerpos neutralizantes IFNγ e IL-4. Por consiguiente, la presente invención proporciona un medio para expandir células precursoras Th17. Este aspecto de la invención se basa en el descubrimiento inesperado de que la coestimulación con ICOS de los linfocitos T CD4⁺ en presencia de citocinas de polarización Th17 dio lugar a una secreción elevada de IL-17A, mientras que prácticamente ninguna de las células comprometidas con CD28 produjo IL-17A.

En una realización particular de la invención, un linfocito T puede estimularse mediante la puesta en contacto de un agente con una fracción de superficie celular en el linfocito T. En un aspecto de la presente invención, los anticuerpos para CD3 e ICOS se cargan en una aAPC. En otro aspecto de la presente invención, cualquier ligando que se una al complejo TCR/CD3 e inicie una señal de estimulación primaria puede utilizarse como un agente de activación primario cargado o expresado por la aAPC. Cualquier ligando que se una a ICOS e inicie la vía de transducción de señales de ICOS, lo que provoca la coestimulación de la célula con un ligando CD3 y mejora la activación de una población de linfocitos T, es un ligando de ICOS y, en consecuencia, es un agente coestimulador.

En otros aspectos de la presente invención, los linfocitos T se pueden exponer a una perla que comprende un primer agente que se une al complejo TCR/CD3 e inicia una señal de estimulación primaria y un segundo agente que se une a ICOS e inicia la ruta de transducción de señales de ICOS, causando así la coestimulación de la célula con un ligando CD3 y la mejora de la activación de una población de linfocitos T.

Las células estimuladas mediante los métodos de la presente invención se activan como se muestra mediante la inducción de la transducción de señales, la expresión de marcadores de superficie celular y/o la proliferación. Los marcadores apropiados para los linfocitos Th17 incluyen, pero no se limitan a, su capacidad para secretar niveles elevados de IL-17A, IL-17F y CCL20. Además, las células generadas y expandidas de acuerdo con el método de coestimulación con ICOS de la invención no solo exhiben una producción elevada de citocinas asociadas a Th17, sino que también muestran una secreción elevada de IFN γ , TNF α e IL-21 en comparación con las células coestimuladas con CD28.

En el contexto de la generación de linfocitos Th17 mediante la estimulación con ICOS en linfocitos T, se puede diseñar una aAPC para comprender un primer agente que se une al complejo TCR/CD3 del linfocito T y un segundo agente que se une a ICOS, pudiendo ser adicionalmente diseñada la aAPC para comprender una citocina que promueve la diferenciación de Th17. Las citocinas de diferenciación Th17 ejemplares incluyen, pero no se limitan a, IL-2, IL-6, IL-23 e IL-1.

Por consiguiente, en determinados aspectos, la presente invención incluye una aAPC que se han modificado genéticamente para expresar agentes estimuladores, agentes coestimuladores y/o citocinas, así como otros polipéptidos. La invención abarca una aAPC transducida con un ácido nucleico que codifica al menos una citocina. La aAPC puede diseñarse para expresar y segregar cualquier citocina deseable que promueva la diferenciación de Th17 utilizando los métodos desvelados en el presente documento o métodos conocidos en la materia para modificar genéticamente una célula.

Por lo tanto, la invención abarca una citocina, que incluye un fragmento, homólogo, variante o mutante de longitud completa de la citocina. Una citocina incluye una proteína que es capaz de afectar la función biológica de otra célula. Una función biológica afectada por una citocina puede incluir, aunque no de forma limitativa, crecimiento celular, diferenciación celular o muerte celular. Preferentemente, una citocina de la presente invención es capaz de unirse a un receptor específico en la superficie de una célula, afectando así la función biológica de una célula. Preferentemente, la citocina promueve la diferenciación de Th17.

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 de factor de necrosis tumoral y/o una quimiocina. Una citocina de la invención incluye, pero no se limita a, factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de necrosis tumoral beta (TNF β), factor estimulador 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), interleucina-23 (IL-23), interferón alfa (IFN α), interferón beta (IFN β), interferón gamma (IFN γ) e IGIF, entre muchas otras. Una citocina más preferida de la invención incluye una citocina que promueve la diferenciación de Th17 que incluye pero no se limita a IL-2, IL-6, IL-1 (por ejemplo, IL-1 β). Un experto en la materia apreciaría, una vez armado con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que la invención abarca cualquier citocina promotora de la diferenciación Th17, como las conocidas en la materia, así como cualquiera descubierta en el futuro.

Además de diseñar una aAPC para comprender una citocina promotora de la diferenciación Th17, la aAPC se puede diseñar para que comprenda una molécula inhibidora que pueda bloquear una citocina que interfiera con el proceso de diferenciación de Th17. Por ejemplo, la aAPC se puede diseñar para secretar un anticuerpo neutralizante que puede inhibir una citocina que interfiere con la diferenciación de Th17. Una citocina que interfiere con el proceso de diferenciación de Th17 incluye, pero no se limita a, IFN γ e IL-4.

Cuando la aAPC se ha diseñado para expresar una citocina deseada que promueve la diferenciación de Th17 y/o un inhibidor de una citocina que interfiere con la diferenciación de Th17, la invención proporciona un método para activar y/o estimular una población de linfocitos T para promover la diferenciación de Th17 en ausencia de citocinas exógenamente añadidas. Además, dicha diferenciación de Th17 puede ocurrir *in vivo*.

En otra realización, las células estimuladas con ICOS de la invención se pueden manipular adicionalmente para que sean específicas de antígeno. Por ejemplo, las células estimuladas con ICOS se pueden redirigir genéticamente aún más para mostrar actividad antitumoral. En una realización, los linfocitos T se someten a coestimulación con ICOS en presencia de citocinas de polarización Th17 (IL-1 β , IL-6, IL-23 y anticuerpos neutralizantes contra IL-4 e IFN γ). Estas células estimuladas con ICOS, tras la redirección genética, pueden mediar una regresión tumoral superior en comparación con los linfocitos Tradicionalmente expandidas con CD28. Por ejemplo, los linfocitos T se expanden con anti-CD3/ICOSL y luego se modifican genéticamente con un inmunorreceptor quimérico para conferir especificidad para un antígeno tumoral deseado. Este aspecto de la invención se basa en el descubrimiento de que, bajo condiciones de polarización Th17, la señalización de ICOS promueve la generación de linfocitos T humanos inflamatorios con una capacidad antitumoral superior a las generadas con CD28. Los beneficios de la señalización de ICOS sobre CD28 fue un descubrimiento inesperado porque antes de la presente invención, la molécula coestimuladora de CD28 se consideraba la preferida para expandir los linfocitos T humanos.

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que las metodologías de estimulación celular descritas en el

presente documento pueden llevarse a cabo en una variedad de entornos (es decir, contenedores). Por ejemplo, dichos contenedores pueden ser matraces de cultivo, bolsas de cultivo o cualquier contenedor capaz de contener células, preferentemente en un ambiente estéril. En una realización de la presente invención, también es útil un biorreactor. Por ejemplo, varios fabricantes actualmente fabrican dispositivos que se pueden utilizar para cultivar células y utilizarse en combinación con los métodos de la presente invención. Véase, por ejemplo, las patentes que cubren biorreactores como las patentes de EE.UU. n.º 6.096.532; 5.985.653; 5.888.807; 5.190.878.

Poblaciones Celulares

Los linfocitos T colaboradores (también conocidos como linfocitos T efectores o linfocitos Th) son un subgrupo de linfocitos (un tipo de glóbulo blanco o leucocito) que desempeña un papel importante para establecer y maximizar las capacidades del sistema inmunitario y, en particular, para activar y dirigir otras células inmunitarias. Se han identificado diferentes tipos de linfocitos Th que se originan en el resultado de un proceso de diferenciación y se asocian con un fenotipo específico. Tras el desarrollo de los linfocitos T, madurado, indiferenciado (lo que significa que nunca han estado expuestos al antígeno al que pueden responder) los linfocitos T abandonan el timo y comienzan a diseminarse por todo el cuerpo. Los linfocitos T indiferenciados pueden diferenciarse en un fenotipo T-colaborador 1 (Th1), T-colaborador 2 (Th2), T-colaborador 17 (Th17) o linfocito T regulador (Treg).

Cada uno de estos tipos de linfocitos Th segrega citocinas, proteínas o péptidos que estimulan o interactúan con otros leucocitos, incluidos los linfocitos Th. Sin embargo, cada tipo celular tiene un fenotipo y una actividad peculiar que interfiere y, a menudo, entra en conflicto con la otra.

Th1, Th2 y Th17 (T-colaborador inflamatorio o Th inflamatorio), promueven respuestas inflamatorias a través de la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6, TNF- α , IL-17, IL21, IL23, y/o a través de la activación y/o inhibición de otros linfocitos T, incluidos otros linfocitos Th (por ejemplo, los linfocitos Th1 suprimen Th2 y Th17, Th2 suprime Th1 y Th17). Los Treg, en cambio, son un componente del sistema inmunitario que suprime las actividades biológicas de otras células asociadas a una respuesta inmunitaria. En particular, los Treg pueden segregar citocinas inmunosupresoras TGF- β e interleucina 10, y se sabe que son capaces de limitar o suprimir la inflamación.

La presente invención se basa en el descubrimiento de los atributos de coestimulación con ICOS para la expansión de linfocitos Th17. Por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺ se activaron en presencia de citocinas de polarización Th17 con una coestimulación con ICOS que exhibió características de Th17. Dichas metodologías se pueden utilizar terapéuticamente en un entorno *ex vivo* para activar y estimular la infusión de células en un paciente o se podrían utilizar *in vivo* para inducir acontecimientos de señalización celular en una población de células diana.

Los linfocitos Th17 o de otro modo células que exhiben un fenotipo de linfocitos Th17 pueden tener una variedad de propiedades fenotípicas específicas, dependiendo de las condiciones empleadas. Dichas propiedades fenotípicas incluyen la producción de IL-17A e IFN γ . Además, las células expandidas de acuerdo con los métodos de la invención continúan produciendo ambos acontecimientos, IL-17A e IFN γ , después de su expansión primaria. En algunos casos, las células comprometidas con ICOS coexpresaron ROR γ t y T-bet, factores de transcripción que regulan el desarrollo de los linfocitos Th17 y Th1, respectivamente. En algunos casos, los linfocitos T del cordón umbilical comprometidos con ICOS coexpresaron IL-23R y CD161 en su superficie celular, marcadores fenotípicos asociados con los linfocitos Th17 del cordón umbilical. En algunos casos, las células estimuladas con ICOS expresaron ROR γ t.

En una realización, la invención proporciona una población purificada de células precursoras de Th17 de la sangre del cordón umbilical ICOS⁺CD28⁺ que secretan niveles elevados de CCL20, IL-17F e IFN γ tras el compromiso con ICOS en comparación con el compromiso con CD28. El compromiso con ICOS no solo aumentó la función de los linfocitos Th17 precursores de ICOS⁺CD28⁺, sino que también promovió su expansión. Se cree que este nuevo subconjunto de células CD4 de la sangre del cordón umbilical son emigrantes tímicos recientes, que expresan ICOS de manera constitutiva, y se imprimen como linfocitos Th17 a través de la participación del ICOS. Este nuevo subconjunto de células CD4 presenta características inflamatorias con capacidad antitumoral. Además, la divulgación presentada en el presente documento demuestra que la señalización de ICOS promueve la generación de linfocitos T humanos inflamatorios con una capacidad antitumoral superior a las generadas con CD28. Las células de la presente invención se pueden utilizar en aplicaciones clínicas para el diseño de inmunoterapias para pacientes con cáncer, enfermedades infecciosas y autoinmunidad.

Las poblaciones de linfocitos T de la presente invención también pueden ser linfocitos T específicos de antígeno, por ejemplo, linfocitos T específicos de antígeno tumoral. En determinadas realizaciones, los linfocitos T específicos de antígeno se pueden generar de acuerdo con los métodos de estimulación con ICOS de la presente invención. En determinadas realizaciones, los linfocitos T específicos de antígeno se pueden administrar a un mamífero que lo necesite como una terapia antitumoral.

Terapia

La invención abarca una aAPC donde el ligando coestimulador es un compañero de unión afín que se une específicamente con una molécula coestimuladora, así como donde el ligando es un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimuladora, y cualquier combinación de las mismas, de manera que una sola aAPC puede comprender tanto ácidos nucleicos que codifican ligandos coestimuladores como anticuerpos

- 5 específicos para moléculas coestimuladoras presentes en el linfocito T, y cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, la aAPC comprende un ligando para ICOS. Esto se debe a que la presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la coestimulación con ICOS en lugar de la coestimulación con CD28 expande preferentemente células con un fenotipo Th17.
- 10 En una realización, la invención abarca el uso de una aAPC que es capaz de activar ICOS en un linfocito T para estimular los linfocitos T *in vivo*. Por ejemplo, la invención incluye el uso de ICOSL aAPC para estimular los linfocitos T *in vivo*. Los linfocitos T pueden haber sido diseñados previamente *in vitro* y después de la infusión a un paciente, potenciados con la vacuna ICOSL aAPC. Como alternativa, la ICOSL aAPC puede cargarse con antígenos y utilizarse como una vacuna previa para estimular una respuesta Th17.

- 15 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para activar linfocitos T específicos de antígeno. El método comprende cultivar linfocitos T con un primer agente que sea capaz de proporcionar una señal de activación primaria al linfocito T (por ejemplo, anticuerpo anti-CD3) y un segundo agente que sea capaz de activar ICOS en el linfocito T (anticuerpo anti-ICOS). Preferentemente, los linfocitos T se cultivan en presencia de citocinas de polarización Th17 cuando los linfocitos T se estimulan con un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria al linfocito T (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3) y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en el linfocito T (anticuerpo anti-ICOS). Los linfocitos T estimulados con ICOS se redirigen genéticamente con un receptor de antígeno quimérico deseado que reconoce un antígeno tumoral. Por lo tanto, una realización de la invención incluye generar una población de linfocitos T estimulada con ICOS antes de poner en
- 20 contacto el linfocito T con un antígeno.

- En determinadas realizaciones, una población de linfocitos T primero se pone en contacto con antígeno, y luego se somete a estimulación con ICOS de acuerdo con la invención. En una realización particular, los linfocitos T específicos de antígeno se inducen mediante la vacunación de un paciente con un antígeno particular, ya sea solo o
- 30 en combinación con un adyuvante o pulsado en células dendríticas. Las células específicas de antígeno para su uso en expansión utilizando el método de estimulación con ICOS de la invención también pueden generarse *in vitro*.

- Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para expandir linfocitos T específicos de antígeno, que comprende poner en contacto una población de linfocitos T con un antígeno durante un tiempo suficiente para inducir la activación de linfocitos T específicos para dicho antígeno; poner en contacto dicha población de linfocitos T
- 35 específicos de antígeno *ex vivo* de acuerdo con el método de estimulación con ICOS de la invención en condiciones y durante el tiempo suficiente para inducir la proliferación de linfocitos T específicos para dicho antígeno, expandiendo así los linfocitos T específicos de antígeno. En una realización, el antígeno es un antígeno tumoral. En otra realización, el antígeno es pulsado o expresado mediante una célula presentadora de antígeno. En una realización adicional, la población de linfocitos T se pone en contacto con dicho antígeno *in vivo*. En otra realización más, la población de linfocitos T se pone en contacto con dicho antígeno *ex vivo*. En otra realización, el método comprende al menos una ronda de clasificación de tetrámero MHC peptídico de dichos linfocitos T específicos de antígeno. En determinadas realizaciones, el método de la presente invención comprende además al menos una
- 40 ronda de selección magnética de tetrámero péptido-MHC de dichos linfocitos T específicos de antígeno.

- 45 Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para el tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente con cáncer linfocitos T específicos de antígeno expandidos de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento.

- 50 Las células generadas de acuerdo con la presente invención también se pueden utilizar para tratar enfermedades autoinmunitarias. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen pero no se limitan a: síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA, que es una enfermedad viral con un componente autoinmune), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de oído interno autoinmunitaria (AIED), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad de Behcet, miocardiopatía, enfermedad celíaca-dermatitis hepatoforme; síndrome de disfunción inmunitario de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), penfigoide cicatricial, enfermedad aglutinina
- 55 fría, síndrome de cresta, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis juvenil, lupus discóide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, trombocitopenia púrpura idiopática (ITP), nefropatía de IgA, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Minière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriática, fenómenos de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (PSS), también conocida como esclerosis sistémica (SS)), síndrome de Sjogren, síndrome del hombre
- 60
- 65

rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerativa, uveítis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

Las células generadas de acuerdo con la presente invención también se pueden utilizar para tratar trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, trastornos inflamatorios crónicos y agudos. Ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen enfermedad de Alzheimer, asma, alergia atópica, alergia, aterosclerosis, asma bronquial, eccema, glomerulonefritis, enfermedad de injerto frente a hospedador, anemias hemolíticas, osteoartritis, sepsis, accidente cerebrovascular, trasplante de tejidos y órganos, vasculitis, retinopatía diabética y lesión pulmonar inducida por ventilador.

La presente invención también se puede utilizar en métodos para prevenir, inhibir o reducir la presencia de un cáncer o células malignas en un animal, que comprenden administrar a un animal una cantidad eficaz contra el cáncer de las células antitumorales de la invención.

Los cánceres contemplados por la presente invención, contra los cuales se induce la respuesta inmunitaria, o que se deben prevenir, inhibir o reducir en presencia, pueden incluir, pero no se limitan a, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, leucemia, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, mieloma múltiple, carcinoma hepatocelular, carcinoma nasofaríngeo, ALL, AML, CML, CLL, y otras neoplasias conocidas en la materia.

Como alternativa, las composiciones como se describen en el presente documento se pueden utilizar para inducir o mejorar la capacidad de respuesta a organismos patógenos, tales como virus, (por ejemplo, virus de ARN de cadena simple, virus de ADN de cadena simple, virus de ADN de cadena doble, VIH, virus de la hepatitis A, B y C, VHS, CMV, EBV, HPV), parásitos (por ejemplo, patógenos de protozoos y metazoos como las especies de Plasmodia, especies de Leishmania, especies de Schistosoma, especies de Trypanosoma), bacterias (por ejemplo, Mycobacteria, Salmonella, Streptococci, E. coli, Staphylococci), hongos (por ejemplo, especies de Candida, especies de Aspergillus) y Pneumocystis carinii.

La respuesta inmunitaria inducida en el animal mediante la administración de las composiciones objeto de la presente invención puede incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas por linfocitos T CD8+, capaces de destruir linfocitos Tumorales e infectadas, y respuestas de linfocitos T CD4+. También se pueden inducir respuestas inmunitarias humores, mediadas principalmente por los linfocitos B que producen anticuerpos después de la activación de los linfocitos T CD4+. Se puede utilizar una variedad de técnicas para analizar el tipo de respuestas inmunitarias inducidas por las composiciones de la presente invención, que están bien descritas en la materia; por ejemplo, Coligan et al., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons Inc., 1994.

Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz inhibidora de tumores" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar se puede determinar por un médico, teniendo en cuenta las diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, grado de infección o metástasis y condición del paciente. En general, se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende las células objeto de la invención, se puede administrar en una dosis que se determinará durante los ensayos clínicos apropiados. Las células de la invención también pueden administrarse múltiples veces en estas dosificaciones. El experto en la materia de la medicina puede determinar fácilmente la dosis óptima y el régimen de tratamiento para un paciente en particular mediante el control del paciente para detectar signos de enfermedad y ajustar el tratamiento en consecuencia.

Las células de la invención se pueden administrar en dosis y vías y, en ocasiones, se determinarán en ensayos clínicos apropiados. Las composiciones celulares se pueden administrar varias veces en dosis dentro de estos intervalos. Las células de la invención se pueden combinar con otros métodos. Las células de la invención para administración pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas para el paciente que se encuentra en terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (por ejemplo, PHA) o linfocinas, citocinas y/o quimiocinas (por ejemplo, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1- α , etc.) como se describe en el presente documento para mejorar la inducción de la respuesta inmunitaria.

La administración de las células de la invención se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente. Las células de la presente invención pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, mediante inyección intravenosa (i.v.), o por vía intraperitoneal. En algunos casos, las células de la invención se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En otros casos, las células de la invención se administran mediante inyección i.v. En otros casos, las células de la invención se inyectan directamente en un tumor o ganglio linfático.

Las células de la invención también se pueden administrar utilizando cualquier número de matrices. La presente invención utiliza dichas matrices dentro del nuevo contexto de actuar como un órgano linfoide artificial para soportar, mantener o modular el sistema inmunitario, normalmente a través de la modulación de los linfocitos T. Por consiguiente, la presente invención puede utilizar aquellas composiciones y formulaciones matriciales que han

demostrado utilidad en la ingeniería de tejidos. Por consiguiente, el tipo de matriz que se puede utilizar en las composiciones, dispositivos y métodos de la invención es virtualmente ilimitado y puede incluir matrices tanto biológicas como sintéticas. En un ejemplo particular, se utilizan las composiciones y dispositivos expuestos por las patentes de EE.UU. n.º 5.980.889; 5.913.998; 5.902.745; 5.843.069; 5.787.900; o 5.626.561. Las matrices comprenden características comúnmente asociadas con ser biocompatibles cuando se administran a un hospedador mamífero. Las matrices pueden estar formadas de materiales naturales y/o sintéticos. Las matrices pueden ser no biodegradables en los casos donde es deseable dejar estructuras permanentes o estructuras desechables en el cuerpo de un animal, como un implante; o biodegradables. Las matrices pueden tomar la forma de esponjas, implantes, tubos, almohadillas telfa, fibras, fibras huecas, componentes liofilizados, geles, polvos, composiciones porosas, o nanopartículas. Además, se pueden diseñar matrices para permitir la liberación sostenida de células sembradas o citocinas producidas u otros agentes activos. En determinadas realizaciones, la matriz de la presente invención es flexible y elástica, y puede describirse como una estructura semisólida que es permeable a sustancias tales como sales inorgánicas, fluidos acuosos y agentes gaseosos disueltos, incluido el oxígeno.

En el presente documento se utiliza una matriz como ejemplo de una sustancia biocompatible. Sin embargo, la presente invención no se limita a matrices y, por lo tanto, donde quiera que aparezca el término matriz o matrices, estos que términos deben leerse para incluir dispositivos y otras sustancias que permiten la retención celular o el desplazamiento celular, son compatibles y son capaces de permitir el cruce de macromoléculas ya sea directamente a través de la sustancia de manera que la sustancia en sí misma sea una membrana semipermeable o se use junto con una sustancia semipermeable particular.

En un aspecto de la presente invención, las células de la invención se pueden utilizar *in vivo* como un adyuvante como se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.464.973. En una realización adicional, las células de la invención se pueden utilizar como una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria *in vivo* contra un antígeno de interés tal como los descritos en el presente documento (por ejemplo, antígenos tumorales, antígenos virales, autoantígenos, etc.). En una realización, las células de la invención se pueden utilizar para generar una respuesta inmunitaria *in vivo*, ya sea administrada sola o en combinación con otros reguladores inmunitarios y en combinación con otras terapias conocidas.

Ejemplos

La invención se describe ahora en referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos y la invención no debe interpretarse de ninguna manera como limitada a estos ejemplos, sino que debe interpretarse para abarcar cualquiera y todas las variaciones que se vuelven evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

Los linfocitos T colaboradores humanos 17 (Th17) regulan la defensa del hospedador, la autoinmunidad y la inmunidad tumoral. Aunque se han identificado las citocinas que controlan el desarrollo de linfocitos Th17 humanos, las moléculas coestimuladoras importantes para la generación de linfocitos Th17 son desconocidas. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que el coestimulador inducible (ICOS) fue fundamental para la diferenciación y expansión de los linfocitos Th17 humanos. La sangre del cordón humano contenía un subconjunto de linfocitos T CD161+CD4+ que eran emigrantes recientes del timo, que expresaban de forma constitutiva ICOS, y se imprimieron como linfocitos Th17 a través de la señalización de ICOS. La estimulación con ICOS indujo la expresión de c-MAF, RORC2 y T-bet en estas células, lo que llevó a un aumento de la secreción de interleucina-21 (IL-21), IL-17 e interferón- γ (IFN- γ) en comparación con las células estimuladas con CD28. Por el contrario, la ligadura de CD28 anuló la coestimulación con ICOS, amortiguando la expresión de RORC2 al tiempo que promovía la expresión del receptor de hidrocarburo arilo, lo que llevó a una secreción reducida de IL-17 y una producción mejorada de IL-22 en comparación con las células estimuladas con ICOS. Además, ICOS promovió la expansión consistente de los linfocitos T humanos IL-17+IFN- γ +, y la actividad antitumoral de estas células después de la transferencia adoptiva en ratones con tumores humanos grandes fue superior a la de las células expandidas con CD28. La eficacia terapéutica de las células expandidas con ICOS se asoció con una funcionalidad mejorada y el injerto *in vivo*. Estos hallazgos revelan un papel vital para la señalización de ICOS en la generación y el mantenimiento de linfocitos Th17 humanos y sugieren que los componentes de esta vía podrían ser dirigidos terapéuticamente para tratar el cáncer o la infección crónica y, a la inversa, que la interrupción de esta vía puede tener utilidad en la esclerosis múltiple y otros síndromes autoinmunitarios. Estos hallazgos han proporcionado la razón para diseñar nuevos ensayos clínicos para la inmunoterapia de tumores.

Los materiales y métodos empleados en los experimentos descritos en el presente documento se describen ahora.

Purificación celular

Las muestras de sangre se obtuvieron del Centro de Inmunología Humana de la Universidad de Pennsylvania. Los linfocitos T CD4+ de sangre periférica se aislaron negativamente y los subconjuntos adultos puros en > 95 % de linfocitos T CD4+ TH1, TH2, Th 17, Treg y TFH se purificaron aún más como se describe (Acosta-Rodríguez et al., 2007 Nat. Immunol. 8:639-646; Liu et al., 2006 J. Exp. Med. 203:1701-1711; Rasheed et al., 2006 Eur. J. Immunol. 36:1892-1903).

Activación de linfocitos T con perlas o aAPC

Para la estimulación, se cultivaron 1×10^6 linfocitos T CD4⁺ con 3×10^6 perlas activadoras recubiertas con anticuerpos contra CD3, CD28 y/o ICOS o con $0,5 \times 10^6$ aAPC transducidas con CD32 que llevan CD80, CD86, CD70, ICOSL, OX40L o 4-1BBL. Los métodos de generación de aAPC y expansión de linfocitos T se describen en otra parte (Parry et al., 2009 J. Immunol. 171:166-174; Suhoski et al., 2007 Mol. Ther. 15:981-988). Los cultivos se monitorizaron para determinar el volumen celular y se enumeraron a través de Coulter Multisizer 3 (Beckman Coulter).

Cultivo celular y polarización de linfocitos TH1, TH2, Th17 y Treg

Las células se cultivaron en medios de cultivo RPMI 1640 como se describió previamente en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 % (Turka et al., 1990 J. Immunol. 144:1646-1653). Para los experimentos de polarización, las células se sembraron con perlas recubiertas con anticuerpo o aAPC. Se añadió IL-2 (50 a 100 UI/ml) el día 3 y los medios se reemplazaron como se describió anteriormente (Suhoski et al., 2007 Mol. Ther. 15:981-988; Maus et al., 2002 Nat. Biotechnol. 20:143-148). Para la polarización de linfocitos Th17, como se indica, IL-1b (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-23 (20 ng/ml) y anticuerpos neutralizantes (10 mg/ml) contra IL-4 e IFN- γ (eBioscience) se agregaron el día 0 y se mantuvieron durante todo el experimento. Los experimentos se realizaron con suero de ternera fetal que contenía fuentes endógenas de TGF- β . En los experimentos indicados, se agregaron IL-21 (25 ng/ml) (eBioscience) y un anticuerpo contra IL-2 (5 mg/ml) (R&D Systems) a los linfocitos T polarizados a Th17.

Para la polarización de linfocitos TH1, se agregaron IL-12 (5 ng/ml) y anticuerpos neutralizantes contra IL-4 (eBioscience) el día 0. Para la polarización de linfocitos TH2, se agregaron IL-4 (5 ng/ml) y anticuerpos neutralizantes contra IFN- γ (eBioscience) el día 0 y se mantuvieron durante todo el experimento. Para la polarización de linfocitos Treg, se agregaron TGF- β (5 ng/ml) y rapamicina (50 ng/ml) el día 0 y se mantuvieron durante todo el experimento. Las células y el sobrenadante se recogieron en varios días a lo largo de cultivos primarios y secundarios a corto y largo plazo para la tinción intracelular y/o ELISA.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El ARN se extrajo con el kit de aislamiento RNAqueous (Ambion), y luego el DNA complementario (ADNc) se transcribió con iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad) y se usó como plantilla para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Taqman de las muestras especificadas. La expresión de RORC2, Tbx21 (T-bet), FoxP3, AHR, c-MAF, IL-17A, IL-21 e IL-23R se evaluó con cebadores y sondas específicas (Applied Biosystems) a través del sistema Applied Biosystems 7500 Fast. La expresión génica se normalizó a la expresión del gen humano b-actina. La cuantificación relativa se realizó con linfocitos T CD4⁺ no manipulados como referencia.

Tinción superficial e intracelular

Para la tinción intracelular de citocinas, se incubaron las células durante 5 horas con PMA (20 ng/ml) (Sigma) e ionomicina (2 mg/ml) (Sigma) y GolgiStop (BD). Se realizó la tinción de la superficie, seguida de la tinción intracelular, como se describió anteriormente, con un citómetro de flujo LSR II (BD Biosciences) y el software FlowJo (Tree Star Inc.). RORC2, T-bet y FoxP3 se tiñeron con tampones de tinción FoxP3 (eBioscience).

Ratones

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Pennsylvania aprobó todos los experimentos con animales. Los ratones NSG se adquirieron en The Jackson Laboratory y se criaron en el vivero de la Universidad de Pennsylvania. Los ratones se alojaron en condiciones específicas libres de patógenos en jaulas de aislamiento y se les proporcionó acceso libre a comida autoclavada y agua acidificada.

Evaluación *in vivo* de los linfocitos T anti-CAR de mesotelina

Como se describió anteriormente, se generó una proteína de fusión quimérica anti-fragmento variable de cadena única (scFv) de mesotelina que contiene los dominios de señalización del receptor 4-1BB y de linfocitos T (TCRz) (Carpenito et al., 2009 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106:3360-3365). Los tumores de xenoinjerto M108 se establecieron como se describió anteriormente (Carpenito et al., 2009 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106:3360-3365) en ratones NSG antes de la transferencia adoptiva de linfocitos Th17. Los tumores se midieron con calibradores y su área se calculó multiplicando la longitud por el ancho.

Análisis estadístico

Los datos de crecimiento tumoral se analizaron mediante métodos de tabla de vida con un modelo lineal de efectos mixtos a través de un enfoque conservador de corrección de Bonferroni. Los valores de $P < 0,005$ se consideraron estadísticamente significativos. Otros datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), prueba de

Scheffé o prueba de t de Student. Los valores de $P = 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los resultados de los experimentos desvelados en el presente documento se describen ahora.

Ejemplo 1: ICOS y CD28 tienen efectos distintos en los subconjuntos de linfocitos T CD4+ humanos

ICOS se identificó originalmente como una molécula expresada en linfocitos T solo después de la activación (Hutloff et al., 1999 Nature 397:263-266). La expresión constitutiva de ICOS se encontró más tarde en una subpoblación de linfocitos T de memoria efectores murinos en reposo, linfocitos Treg y linfocitos T colaboradores foliculares (TFH, de sus siglas en inglés) (Burmeister et al., 2008 J. Immunol. 180:774-782; Ito et al., 2008 Immunity 28:870-880; King et al., 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:741-766). Dada la reciente identificación de linfocitos Th17 humanos, se diseñaron experimentos para examinar si ICOS también se expresaba de forma constitutiva en estas células. Los linfocitos T CD4+ de sangre periférica en reposo se clasificaron en varios subconjuntos en función de su expresión de receptores de quimiocinas y otras moléculas de la superficie celular. Esta estrategia proporcionó los subconjuntos TH1 (CXCR3+CCR4-CCR6-), TH2 (CCR4+CXCR3-CCR6-), Th17 (CCR4+CCR6+), Treg (CD25+CD127lo), y TFH (CXCR5+CD45RO+) (Acosta-Rodríguez et al., 2007 Nat. Immunol. 8:639-646; Liu et al., 2006 J. Exp. Med. 203:1701-1711; Rasheed et al., 2006 Eur. J. Immunol. 36:1892-1903). De manera sorprendente, el 40 % de las células en el subconjunto Th17 expresaron de manera constitutiva ICOS, mientras que los subconjuntos TH1 y TH2 no expresaron ICOS (Figuras 1A y 1B). Como se esperaba, los subconjuntos Treg y TFH expresaron de manera constitutiva ICOS (Burmeister et al., 2008 J. Immunol. 180:774-782; Ito et al., 2008 Immunity 28:870-880; King et al., 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:741-766), mientras que todos los subconjuntos expresaron de manera constitutiva CD28 en niveles altos (Figuras 1A y 1B).

Dado que los subconjuntos de linfocitos T humanos expresan de manera constitutiva cantidades variables de ICOS y CD28, el siguiente conjunto de experimentos se diseñó para evaluar los efectos funcionales de la señalización a través de estas moléculas particulares en cada subconjunto. Por lo tanto, los subconjuntos se clasificaron como se describió anteriormente y luego se estimularon con anticuerpos contra las perlas CD3/CD28 o CD3/ICOS. La producción de IL-2, IL-4, interferón- γ (IFN- γ), IL-10, IL-22, IL-17A, IL-17F, CCL20 e IL-21 se midió mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Figura 1C).

Como se esperaba, todos los subconjuntos excepto los linfocitos Treg secretaron cantidades sustanciales de IL-2 después de la estimulación con CD28 (Figura 1C, i). Por el contrario, la coestimulación con ICOS no desencadenó la secreción de IL-2, lo que corrobora el descubrimiento previo de que CD28, pero no ICOS, media la producción de IL-2 en los linfocitos T (Riley et al., 2005 Blood 105: 13-21; Parry et al., 2009 J. Immunol. 171:166-174). Adicionalmente, CD28, pero no ICOS, indujo la producción de IL-4 mediante los linfocitos TH2 (Figura 1C, ii). La secreción de IL-10 e IL-22 se desencadenó tanto por la coestimulación con CD28 como con ICOS de una manera específica del subconjunto, aunque en la mayoría de los subconjuntos, la coestimulación con CD28 indujo cantidades más altas de estas citocinas (Figura 1C, iv y v). Por el contrario, la coestimulación con ICOS de los linfocitos Th17 dio como resultado una producción significativamente mayor de IL-17A, IL-17F, CCL20 e IL-21 en comparación con la coestimulación con CD28 (Figura 1C, vi a ix). De forma notable, los linfocitos Th17 estimulados con ICOS también produjeron mayores cantidades de IFN- γ que los linfocitos TH1 estimulados con CD28, un subconjunto reportado como una fuente dominante de secreción de IFN- γ (Figura 1C, iii). Aunque la coestimulación con ICOS aumenta la función de los linfocitos Th17, es interesante que esta señal no amplificara la función de los linfocitos TH1 o TH2, probablemente porque estas células carecen de ICOS.

Ejemplo 2: ICOS impulsa la diferenciación de linfocitos Th17 humanos

Las moléculas coestimuladoras juegan un papel fundamental en el inicio de las respuestas de linfocitos T (Greenwald et al., 2005 Annu. Rev. Immunol. 23:515-548; Smith et al., 1994 Cell 76:959-962), pero su influencia individual en la funcionalidad de Th17 humano sigue siendo desconocida. Para comprender su impacto respectivo en la función de Th17, los linfocitos T CD4+ de sangre periférica se activaron con APC artificiales cargadas con OKT3 (aAPC) diseñadas para expresar CD86, CD80, CD70, ICOSL, OX40L o 4-1BBL y luego se cultivaron las células en condiciones de polarización Th17 (IL-6, IL-1b, IL-23, IFN- γ neutralizante, y anticuerpos IL-4 neutralizantes en suero que contiene fuentes endógenas de TGF- β). Solo la coestimulación con ICOS inducía de forma reproducible la secreción de IL-17F (Figura 2A), lo que apoya la idea de que ICOS podría desempeñar un papel único en el desarrollo de los linfocitos Th17 humanos.

El siguiente conjunto de experimentos se diseñó para evaluar si el compromiso de ICOS solo podría ser suficiente para inducir la secreción de IL-17F mediante linfocitos T CD4+ no polarizados en masa. Se observó que el compromiso de ICOS no era suficiente para promover una producción significativa de IL-17F en ausencia de condiciones de polarización Th17. Sin embargo, en presencia de condiciones de polarización Th17, ICOS indujo la secreción de IL-17F de linfocitos T CD4+ en masa (Figura 2B). El suministro de la señal ICOS a través de perlas o aAPC fue igualmente eficaz para inducir la secreción de IL-17F (Figura 2B).

Por lo tanto, aunque ICOS fue suficiente para aumentar la secreción de IL-17F en linfocitos CCR4+CCR6+Th17 ya diferenciados (Figura 1C), no fue capaz de inducir la secreción de IL-17F por linfocitos T CD4+ en masa en ausencia de condiciones de polarización Th17 (Figura 2B). Esta incapacidad para detectar IL-17F puede deberse, en parte, a

la baja frecuencia de linfocitos Th17 en linfocitos T CD4+ en masa. Tanto la coestimulación con ICOS como con CD28 son necesarias para la diferenciación de linfocitos Th17 murinos (Park et al., 2005 Nat. Immunol. 6:1133-1141). Por lo tanto, se sospecha que también aumentarán la función de Th17 humano en combinación. Por el contrario, la adición de CD28 con ICOS redujo notablemente la secreción de IL-17F (Figura 2C) y la expresión del ARN mensajero (ARNm) de IL-17A (Figura 2D). Sin embargo, la combinación de estas señales no ejerció un "efecto de veto" similar en la secreción de IL-2, IL-10 o IL-22 (Figura 2, E a G). Estos datos son sorprendentes dado que CD28 se utiliza a menudo para expandir los linfocitos Th17 humanos.

Ejemplo 3: ICOS expande la población de linfocitos T CD4+ humanos IL-17A+IFN-γ+

Aunque ICOS aumentó la función de los linfocitos Th17 humanos en los primeros momentos (día 3 después de la activación), no quedó claro si ICOS respaldó su desarrollo a largo plazo. Para abordar esta pregunta, se midieron la frecuencia y los números absolutos de los linfocitos T CCR4+CCR6+CD4+ a lo largo de su expansión primaria. En los valores iniciales, la frecuencia de linfocitos T CCR4+CCR6+CD4+ fue de aproximadamente 16 % (Figura 3A). Sin embargo, se observó una disminución progresiva en la frecuencia de estas células en el cultivo coestimulado con CD28. Por el contrario, la frecuencia de linfocitos T CCR4+CCR6+CD4+ fue estable, e incluso aumentó ligeramente, en el cultivo coestimulado con ICOS. El crecimiento selectivo de estas células mediante ICOS fue evidente cuando se compararon sus números absolutos con los expandidos con CD28 (Figura 3B). En el cultivo estimulado con ICOS, el número de linfocitos T CCR4+CCR6+CD4+ aumentó más de 30 veces, mientras que en el cultivo estimulado con CD28, su número aumentó durante 5 días y luego volvió a los valores iniciales. Los cultivos conducidos por CD28 tuvieron una mayor frecuencia de células con un fenotipo central tipo memoria (CD62LhiCD27hi), como se informó (Bondanza et al., 2006 Blood 107: 1828-1836), mientras que los cultivos conducidos por ICOS contenían una mayor frecuencia de células con un fenotipo efector tipo memoria (CD62LloCD27lo) (Figura 3C). El siguiente conjunto de experimentos se diseñó para evaluar los efectos de CD28 o ICOS en la función de los linfocitos Th17 humanos a lo largo del tiempo. En cultivos coestimulados con CD28, los linfocitos T CD4+ polarizadas a Th17 produjeron IL-17A después de los primeros 5 a 7 días de expansión (Figura 3D), de acuerdo con informes anteriores. Sin embargo, la frecuencia de las células polarizadas a Th17 comprometidas con CD28 que producen IL-17A o ambas IL-17A e IFN-γ disminuyó casi a los niveles de iniciales al final de su expansión primaria. Por el contrario, la frecuencia de estas células aumentó con el tiempo en los cultivos estimulados con ICOS (Figura 3D), un hallazgo reproducido en varios cultivos independientes. Las células comprometidas con ICOS coexpresaron los factores de transcripción RORC2 y T-bet (Figuras 3F y 3G), reguladores clave de la diferenciación de Th17 y TH1, a mayores concentraciones de ARNm que las células comprometidas con CD28 a lo largo del tiempo. Por lo tanto, ICOS expande la población de linfocitos T IL-17A+IFN-γ+CD4+ (Figura 3E) y esto se relaciona con la inducción de RORC2 y T-bet.

Ejemplo 4: ICOS y CD28 tienen funciones distintas en el desarrollo de linfocitos Th17 procedentes de la sangre del cordón umbilical

Los datos anteriores indicaron que ICOS expande preferentemente los linfocitos Th17 humanos efectores, pero estos datos no discernían si ICOS apoya su desarrollo a partir de linfocitos T CD4+ indiferenciados. Banquet y compañeros de trabajo informaron que ICOS era crucial para la expansión pero no para el desarrollo de linfocitos Th17 murinos (Banquet et al., 2009 Nat. Immunol. 10:167-175). Por lo tanto, el siguiente conjunto de experimentos se diseñó para determinar si los linfocitos T CD4+ indiferenciados se diferencian preferentemente en linfocitos Th17 a través de la señalización de ICOS. Para probar esto, se clasificaron los linfocitos T CD45RA+CD25-CD4+ indiferentes de la sangre del cordón umbilical (UCB), se cultivaron en condiciones de polarización Th17 y se activaron con un anticuerpo contra las perlas CD3 que llevan los anticuerpos contra CD28 y/o ICOS. La función y el fenotipo de los cultivos se evaluaron después de la estimulación primaria (día 11) y secundaria (día 18) (esquema de la Figura 4). IL-17A, IFN-γ, IL-2 y factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) se midieron después de la activación de ionomicina de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Se observó que > 40 % de las células comprometidas con ICOS producían IL-17A solo o IFN-γ solo y que aproximadamente el 20 % de las células comprometidas con ICOS secretaban ambas citocinas. Por el contrario, pocas células comprometidas con CD28 produjeron IL-17A (Figuras 4A y 4B). De hecho, CD28 era funcional en estas condiciones porque el 10 % de estas células producían IFN-γ y > 50 % de estas células producían IL-2 después de la coestimulación con CD28 o con CD28 más ICOS (Figuras 4A y 4C). Sin embargo, solo aproximadamente 10 % de las células secretaron IL-2 después de la estimulación con ICOS solo (Figura 4B). La combinación de la coestimulación con CD28 y ICOS impidió la producción de IL-17A, y estas células produjeron IFN-γ a niveles similares a la estimulación con CD28 solo (Figura 4C). El compromiso primario de las células con ICOS pero no con CD28 indujo una coexpresión sustancial de TNF-α e IL-17A. La expresión de CD161 también se evaluó, ya que los linfocitos Th17 humanos se originan a partir de los precursores de linfocitos T CD161+CD4+ en UCB (Cosmi et al., 2008 J. Exp. Med. 205:1903-1916). Casi la mitad de las células comprometidas con ICOS coexpresó CD161 y el receptor de IL-23 (IL-23R) (Figura 4B), mientras que < 5 % de las células comprometidas con CD28 o CD28 más ICOS fueron positivas para IL-23R y CD161 (Figuras 4A y 4C) y los linfocitos T CD4+CD45RA+CD25- en reposo contienen < 0,5 % de estas células (Figura 8).

El examen de las células después de la expansión secundaria reveló que las células estimuladas originalmente con ICOS continuaron secretando altas cantidades de IL-17A, IFN-γ y TNF-α, y esto fue independiente del modo de coestimulación secundaria (Figura 4E). Del mismo modo, aproximadamente el 30 % de estas células continuaron

coexpresando IL-23R y GD161. Sin embargo, prácticamente ningún linfocito Th17 polarizada de UCB inicialmente estimulada con CD28 o con CD28 más ICOS secretó IL-17A, incluso después de una reestimulación con ICOS (Figuras 4D y 4F). Por lo tanto, la coestimulación con CD28 no bloquea la secreción de IL-17A después de la inducción primaria mediante la coestimulación con ICOS sin oposición (Figuras 4B y 4E). Estos datos sugieren un papel importante para ICOS en la programación del desarrollo de Th17 a partir de linfocitos T CD4+ humanos de UCB.

Ejemplo 5: ICOS aumenta la función de Th17 humano mediante la inducción de c-MAF e IL-21

El siguiente conjunto de experimentos se diseñó para investigar los mecanismos subyacentes a la funcionalidad mejorada de los linfocitos Th17 humanos a través de ICOS. En ratones, ICOS induce el factor de transcripción c-MAF, que, a su vez, transactiva IL-21 y aumenta la función de Th17 (Banquet et al., 2009 Nat. Immunol. 10:167-175). Los siguientes experimentos se realizaron para evaluar si ICOS también induce c-MAF en linfocitos Th17 humanos, dado que ICOS aumenta la secreción de IL-21 (Figura 1C, ix). Los linfocitos T CD4+ humanos de UCB polarizados hacia un fenotipo Th17 expresaron concentraciones de ARNm considerablemente mayores de c-MAF e IL-21 tras la coestimulación con ICOS frente a CD28 (Figuras 5A y 5B). Se observaron resultados similares en linfocitos Th17 humanos de sangre periférica (Figura 9). Por lo tanto, ICOS indujo mayores cantidades de expresión de c-MAF que CD28, correspondiendo con una mayor expresión de IL-21 por linfocitos Th17 humanos estimulados con ICOS. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la IL-21 inducida por ICOS fue parcialmente responsable de la funcionalidad mejorada de los linfocitos Th17 humanos. Por lo tanto, se evaluó si la adición de IL-21 exógena a los linfocitos T CD4+ de UCB polarizados a Th17 estimulados con CD28 aumentaría su potencial para secretar IL-17F.

De acuerdo con estudios previos (Yang et al., 2008 Nature 454:350-352), la adición de IL-21 a células de UCB polarizadas a Th17 estimuladas con CD28 incrementó modestamente su capacidad para secretar IL-17F pero no al nivel alcanzado por células de UCB polarizadas a Th17 estimuladas con ICOS (Figura 5C). Dado que los linfocitos Th17 coestimulados con CD28 secretan cantidades significativamente mayores de IL-2 que los estimulados con ICOS, se cree que IL-2 podría ser responsable de la funcionalidad reducida observada en células de UCB polarizadas a Th17 estimuladas con CD28.

De hecho, la producción de IL-17F se incrementó en los cultivos donde se neutralizó IL-2. Adicionalmente, IL-21 exógena junto con la neutralización de IL-2 en el cultivo de células de UCB polarizadas a Th17 estimuladas con CD28 aumentó aún más la producción de IL-17F, pero aún así no indujo la secreción de IL-17K a un nivel comparable al obtenido mediante estimulación con ICOS (Figura 5C). Por lo tanto, además de la producción de IL-21 mediada por c-MAF, es probable que haya otros factores involucrados en la mediación de la función mejorada con ICOS de las células de UCB humanas polarizadas a Th17.

Ejemplo 6: ICOS induce la expresión de RORC2

Para comprender mejor los mecanismos subyacentes a la forma en que la señalización de ICOS aumentaba la funcionalidad de los linfocitos Th17 humanos, se realizaron experimentos para investigar cómo ICOS regula la expresión celular de RORC2 (RORgt), T-bet (Tbx21) y FoxP3, reguladores clave de linfocitos Th17, TH1, y Treg (Zhu et al., 2010 Annu. Rev. Immunol. 28:445-489), respectivamente. Por lo tanto, RORC2, T-bet y FoxP3 se midieron en linfocitos T CD25-CD4+ de UCB indiferenciados cultivados en condiciones de polarización Th17 a lo largo del tiempo mediante citometría de flujo. En los valores iniciales, las células no expresaron virtualmente ningún RORC2, T-bet o FoxP3; hubo un aumento asociado a la activación transitoria en su expresión en cada cultivo 3 a 5 días después de la estimulación (Figuras 5D y 5E). Sin embargo, al final de su expansión primaria, se observó que > 75 % de las células estimuladas con ICOS expresaban RORC2 (Figuras 5D y 5E, días 7 a 10). Por el contrario, la frecuencia de las células expandidas con CD28 que expresan RORC2, T-bet y FoxP3 disminuyó progresivamente (Figuras 5D y 5E). Del mismo modo, ICOS indujo una mayor expresión de ARNm de RORC2 y T-bet que CD28 (Figuras 5F y 5G), mientras que CD28 indujo una expresión de ARNm mayor pero transitoria de FoxP3 que ICOS en estas células (Figura 5H).

Similar a los datos de sangre periférica (Figura 2F y Figura 10), CD28 indujo una expresión más alta de los transcritos de AHR que ICOS (Figura 5I), lo que probablemente dio como resultado su mayor producción de IL-22 (Figura 5J). Estos datos son consistentes con los hallazgos en ratones que muestran que el AHR se correlaciona con la producción de IL-22 por parte de los linfocitos T (Veldhoen et al., 2009 J. Exp. Med., 206:43-49; Veldhoen et al., 2008 Nature 453:106-109). La expresión de IL-10 fue comparable en células estimuladas con CD28 o ICOS (Figura 5K), mientras que la expresión de IL-17A fue significativamente mayor en células estimuladas con ICOS frente a CD28 a lo largo del tiempo (Figura 5L). Los transcritos de RORC2 se indujeron de forma estable en grandes cantidades a lo largo del cultivo en comparación con los transcritos de T-bet y FoxP3 en células estimuladas con ICOS (Figuras 5F a 5H).

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que las cantidades de IL-17A con coestimulación con CD28 podrían ser bajas porque las células se diferenciaron en suero sin la adición de TGF- β . De hecho, la titulación de TGF- β en el cultivo en un intervalo de concentración de 3 log10 aumentó la cantidad de IL-17A producida por los linfocitos T CD4+ polarizado con Th17 expandidos con la señal de CD28 pero no las cantidades alcanzadas por las

células estimuladas con ICOS (Figura 11). Estos datos subrayan la noción de que los linfocitos T coestimulados con CD28 están compuestos por linfocitos Th17 que no han alcanzado su potencial inflamatorio completo. Además, revelan la importancia de la disponibilidad de TGF- β en el microambiente, así como la "señalización de veto" de CD28 (Figuras 2C y 2D), que tienen el potencial de regular el potencial inflamatorio de los linfocitos Th17.

Ejemplo 7: Los linfocitos T CD161+CD4+ de UCB expresan de manera constitutiva ICOS

Dado que los linfocitos Th17 se originan a partir de un precursor de linfocitos T CD161+CD4+ de UCB (Cosmi et al., 2008 J. Exp. Med. 205:1903-1916) y que el ICOS es fundamental para aumentar su función, se realizaron experimentos para investigar si estas células expresan ICOS de manera constitutiva. Similar a los linfocitos Th17 CCR4+CCR6+CD4+ de sangre periférica (Figuras 1A y 1B), aproximadamente el 50 % de los linfocitos T CD161+CD4+ en reposo de la sangre del cordón umbilical expresaron ICOS (Figura 6A). Por lo tanto, los siguientes experimentos se realizaron para investigar si los linfocitos T CD161+CD4+ que expresan de manera constitutiva ICOS eran fenotípicamente diferentes de los linfocitos T ICOS-CD161+CD4+.

Dado que las células ICOS+ de la sangre periférica son en gran parte células efectoras de memoria, se planteó la hipótesis de que los linfocitos T de sangre de cordón umbilical ICOS+CD161+CD4+ serían un subconjunto más diferenciado que los linfocitos T ICOS-CD161+CD4+.

Inesperadamente, los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ y ICOS-CD161+CD4+ compartieron un fenotipo indiferenciado similar (Figura 6A), como lo indica la alta expresión comparable de CD45RA, CD127, CD62L y CD27, y la brillante expresión de CD31, que es típica de emigrantes tímicos recientes (Köhler et al., 2009 Blood 114: 290-298).

Ejemplo 8: Los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ se imprimen como linfocitos Th17 a través de la señalización de ICOS

El siguiente conjunto de experimentos se diseñó para investigar si los linfocitos T CD161+CD4+ de sangre del cordón umbilical que expresan ICOS se diferencian en linfocitos Th17 humanos a través de la señalización de ICOS. Por lo tanto, se realizaron experimentos para examinar la función de los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ frente a ICOS-CD161+CD4+ clasificados de UCB que se estimularon con anticuerpos contra perlas CD3/CD28 o CD3/ICOS en condiciones de polarización Th17.

los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ secretaron cantidades más altas de IL-17F, CCL20 e IFN- γ tras el compromiso ICOS en comparación con los linfocitos T ICOS-CD161+CD4+ (Figura 6B). Por el contrario, el compromiso de CD28 medió una secreción ligeramente mayor de IL-10 e IL-22 por los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ que por ICOS-CD161+CD4+. Además, el compromiso de CD28 indujo la secreción de IL-4 por los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+. De forma notable, el compromiso de ICOS pero no de CD28 promovió la expansión sostenida de los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+, como se indica a través de su mayor frecuencia y rendimiento general (Figura 6C).

Se ha informado que los linfocitos T CD161+CD4+ expresan de manera constitutiva RORC2 e IL-23R y que las condiciones de polarización Th17 regulan aún más la expresión de estas moléculas (Cosmi et al., 2008 J. Exp. Med. 205:1903-1916). Dados los resultados presentados en el presente documento, se cree que los linfocitos T CD161+CD4+ que expresan de manera constitutiva ICOS expresarán mayores cantidades de ARNm de RORC2 e IL-23R que los linfocitos T ICOS-CD161+CD4+. Además, sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que el compromiso de ICOS aumentaría aún más la expresión del ARNm de RORC2 e IL-23R en linfocitos T ICOS+CD161+CD4+. De hecho, los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ de UCB en reposo expresaron mayores cantidades de ARNm de RORC2 e IL-23R que los linfocitos T ICOS-CD161+CD4+ en reposo o de UCB en masa (Figura 12). Adicionalmente, el compromiso de ICOS indujo una mayor expresión de ARNm de RORC2 e IL-23R en linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ frente a ICOS-CD161+CD4+ (Figura 6D), correspondiente a su mayor secreción de IL-17F y CCL20 (Figura 6B). Por el contrario, el compromiso de CD28 indujo mayores cantidades de expresión de ARNm de AHR en linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ (Figura 6D), lo que concuerda con su producción aumentada de IL-22 (Figura 6B). Por lo tanto, además de CD161, ICOS podría ser un marcador de superficie para los linfocitos T CD4+ de UCB que se desarrollan en linfocitos Th17.

Dado que la coestimulación de los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ con ICOS indujo específicamente RORC2 e IL-17A, se cree que estas células se imprimieron como linfocitos Th17 a través de la señal ICOS y, en consecuencia, incluso en presencia de condiciones de polarización TH1, TH2 y Treg, estas células continuarían secretando IL-17A y resistirían la diferenciación en linfocitos TH1, TH2 o Treg, respectivamente. Para probar esta noción, los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ e ICOS-CD161+CD4+ se clasificaron y estimularon con anticuerpos contra las perlas recubiertas con CD3/CD28 o CD3/ICOS, y luego se cultivaron en medio solo o en condiciones de polarización TH1, TH2, Th17 y Treg. La coestimulación con ICOS de los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ indujo la secreción de IL-17A incluso en condiciones de polarización TH1, TH2 o Treg, aunque en cantidades variables (Figura 6E). Por el contrario, la coestimulación a través de CD28 indujo cantidades modestas de secreción de IL-17A, incluso en presencia de condiciones de polarización Th17 (Figura 6E). Las condiciones que polarizan los linfocitos T CD4+ de UCB en masa hacia un fenotipo de linfocitos TH1, TH2, Th17 y Treg fueron eficaces porque promovieron la

secreción de IFN- γ , IL-4, IL-17A, o expresión de FoxP3, respectivamente (Figura 13). Por el contrario, la coestimulación con ICOS de los linfocitos T ICOS+CD161+CD4+ fue incapaz de provocar la secreción de IL-4 y no promovió la expresión de FoxP3 cuando se cultivó en condiciones que fomentaron su desarrollo de TH2 o Treg (Figura 13). Independientemente de las condiciones de polarización del subconjunto de linfocitos T y el modo de coestimulación se observó que menos del 5 % de los linfocitos T ICOS-CD161+CD4+ producían IL-17A (Figura 6E). Por lo tanto, los resultados presentados en el presente documento indican que las células con el potencial de diferenciarse en linfocitos Th17 se limitan en gran medida al subconjunto ICOS+ de linfocitos T CD161+CD4+ de UCB y se imprimen rápidamente como linfocitos Th17 a través de la señalización de ICOS.

Ejemplo 9: ICOS aumenta la inmunidad tumoral mediada por linfocitos T

Se ha informado de que los linfocitos T de sangre periférica redirigidas genéticamente se expandieron con anticuerpos contra las perlas de CD3/CD28 mediando los efectos antitumorales consistentes después de la infusión en ratones que llevan xenoinjertos de tumores humanos (Carpenito et al., 2009 Proc. Acad. Sci. U.S.A. 106:3360-3365). Dado el presente hallazgo de que la coestimulación con ICOS en presencia de condiciones de polarización Th17 genera linfocitos T IL-17A+IFN- γ + *in vitro*, se diseñaron experimentos para investigar cómo estas células, tras la redirección genética, afectarían el crecimiento de tumores humanos. Para probar esta pregunta, los linfocitos T de sangre periférica en masa se expandieron con anticuerpos contra las perlas CD3/CD28 o CD3/ICOS en presencia o ausencia de condiciones de polarización Th17 y las modificaron genéticamente con un receptor de antígeno quimérico (CAR) para conferir especificidad para los tumores que expresan mesotelina (esquema de la Figura 7). Los ratones NOD/scid/IL-2R γ null se inyectaron en el flanco con la línea celular M108 del mesotelioma humano y se inyectaron por vía intratumoral con las células redirigidas a partir del día 61 después de la exposición al tumor.

Se observó que los ratones tratados con linfocitos T estimulados con ICOS polarizados con citocinas Th17 experimentaron una regresión tumoral superior en comparación con todos los otros grupos de tratamiento ($P < 0,005$; Figura 7D frente a Figuras 7A a 7C). Solo las células estimuladas con ICOS en presencia de condiciones de polarización Th17 fueron capaces de mediar la regresión de tumores grandes (Figura 7D). Las células estimuladas por CD28 solo o por CD28 más condiciones de polarización Th17 fueron capaces de retardar la progresión del tumor, pero fueron incapaces de mediar la regresión del tumor de larga duración (Figura 7, A a C). La eficacia terapéutica de las células polarizadas estimuladas con ICOS puede ser una consecuencia de su mayor secreción de IFN- γ tras el reconocimiento de antígeno *ex vivo* (Figura 7E) y el aumento del injerto *in vivo* (Figura 7F). Los resultados presentados en el presente documento identifican ICOS y sus vías de señalización cadena abajo como una diana para el desarrollo de la inmunoterapia del cáncer para modificar la función y los números de los linfocitos Th17.

Ejemplo 10: El coestimulador inducible (ICOS) es fundamental para el desarrollo de linfocitos Th17 humanos

Los estudios filogenéticos indican que la molécula de coseñalización ICOS surgió como una duplicación de CD28 y que este acontecimiento coincidió con la aparición de respuestas de anticuerpos de memoria de alta afinidad (Bernard et al., 2007 Immunol. 31:25 5-271). Aunque se conservan muchos aspectos de los parálogos de ICOS y CD28, han surgido varias diferencias importantes. Por ejemplo, el patrón de expresión de CD28 humano y de ratón en el timo y los linfocitos T periféricos es considerablemente diferente (Riley et al., 2005 Blood 105: 13-21; Turks et al., 1990 J. Immunol, 144:1646 1653; Gross et al., 1992 J. Immunol. 149:380-388). Se ha descubierto una diferencia entre la expresión de ICOS en linfocitos T CD4+ humanos y de ratón, donde, a diferencia de los humanos, ICOS no se expresa en emigrantes tímicos recientes en el ratón (Burmeister et al., 2008 J. Immunol. 180:774-782). Los humanos con deficiencia de ICOS tienen pocos linfocitos TFH (Bossaller et al., 2006 J. Immunol. 177:4927-4932) y respuestas TH1, TH2 y Th17 alteradas (Takahashi et al., 2009 J. Immunol, 182: 5515-5527), lo que sugiere que la señalización de ICOS tiene roles no redundantes para la homeostasis de múltiples subconjuntos de linfocitos T CD4+ humanos. Los resultados presentados en el presente documento sugieren que algunas de estas diferencias entre ratones y seres humanos podrían ser el resultado de la expresión más temprana de ICOS durante la ontogenia de linfocitos en seres humanos que en ratones.

Los resultados presentados en el presente documento sugieren que los ligandos de CD28 y ICOS, en concierto con el medio de las citocinas, dictan fundamentalmente el destino de los linfocitos Th17. Estudios anteriores han demostrado que la coestimulación con CD28 puede proporcionar una expansión a corto plazo de linfocitos Th17, y nuestros resultados son consistentes con esos hallazgos. Sin embargo, utilizando un sistema de cultivo basado en ICOS, se han identificado condiciones que permiten la expansión sostenida de los linfocitos Th17 humanos. Dado que ICOSL se expresa de manera constitutiva en muchos tejidos, y la sobreexpresión de ICOSL puede dar como resultado autoinmunidad (Tafari et al., 2001 Nature 409:105-109; Yu et al., 2007 Nature 450:299-303), los resultados presentados en el presente documento aumentan una pregunta sobre cómo se controla la expansión de linfocitos Th17. Los resultados presentados en el presente documento pueden abordar esta paradoja ya que los ligandos de CD28 moderan el crecimiento y el potencial inflamatorio de los linfocitos Th17. Estos datos son particularmente interesantes en la lucha de los datos recientes que describen un nuevo linaje de linfocitos T humanos llamados linfocitos TH22, que se caracterizan por su capacidad para producir IL-22 pero cantidades nominales de IL-17A e IFN- γ (Duhon et al., 2009 Nat. Immunol, 10:857-863). Los resultados presentados en el presente documento sugieren que CD28 puede transformar linfocitos Th17 en linfocitos TH22, mientras que ICOS las transita en linfocitos

TH1/Th17. Los resultados presentados en el presente documento apoyan la idea de que el destino de los subconjuntos de linfocitos T, en particular los linfocitos Th17, parece más flexible en seres humanos que lo apreciado previamente (Murphy et al., 2010 Nat. Immunol. 11:674-680).

- 5 Existen varias implicaciones terapéuticas de estos hallazgos. Una serie de afecciones autoinmunitarias e inflamatorias están asociadas con un aumento de los linfocitos Th17 y sus citocinas asociadas. Por ejemplo, las lesiones cutáneas en la psoriasis muestran una regulación positiva sustancial de CCL20 y CCR6 (Homey et al., 2000 J. Immunol. 164:6621-6632). En la esclerosis múltiple, un subconjunto de pacientes tiene una enfermedad dominada por los linfocitos Th17, y este biomarcador predice la falta de respuesta a la terapia posterior con IFN- β (Axtell et al., 10 2010 Nat. Med. 16:406-412). El equilibrio relativo de las APC con ligandos para ICOS y CD28 es probable que desempeñe un papel en la homeostasis de las poblaciones de linfocitos Th17 patógenas y reguladoras. Por lo tanto, la modulación de la función de ICOS puede tener utilidad terapéutica en ciertos trastornos autoinmunitarios.

- 15 Los linfocitos Th17 también pueden promover la inmunidad antitumoral en ratones y seres humanos (Zou et al., 2010 Nat. Rev. Immunol. 10:248-256; Martin-Orozco et al., 2009 Immunity 31: 787-798; Muranski et al., 2008 Blood 112:362-373). Para la terapia adoptiva, el uso de condiciones de cultivo celular definidas para controlar la disponibilidad de CD28 e ICOSL puede permitir el crecimiento o agotamiento selectivo de los linfocitos Th17 para anular la inflamación crónica o mejorar la inmunidad antitumoral, como se demuestra en el presente documento. La estimulación con ICOS se puede utilizar para generar números clínicamente relevantes de linfocitos Th17 humanos 20 con potentes actividades antitumorales. Actualmente se están diseñando nuevos ensayos clínicos de inmunoterapia para tumores sobre la base de los hallazgos presentados en el presente documento que probarán los efectos antitumorales de los linfocitos Th17 genéticamente reprogramados.

Ejemplo 11: Composiciones farmacéuticas y modos de administración

- 25 Los siguientes experimentos se diseñaron para cultivar linfocitos Th17 para obtener una expansión extensa *in vitro* o *ex vivo* de estas células, mientras que al mismo tiempo se mantienen las condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP, de sus siglas en inglés). En estas condiciones, es deseable cultivar linfocitos Th17 expandidos y mantener su función para preservar sus propiedades terapéuticas.

- 30 Mediante la aplicación de los conceptos y mecanismos actualmente desvelados relacionados con el desarrollo de linfocitos Th17, las células de la invención se pueden aislar de una muestra biológica para tratamiento *ex vivo* y expansión de cultivo a largo plazo. Las células expandidas se pueden administrar a un paciente que lo necesite para tratar una enfermedad. La disponibilidad de un gran número de linfocitos Th17 cultivados permite una 35 caracterización inmunológica, bioquímica y molecular más detallada de estas células. Más importante aún, debido a que los métodos actuales son adaptables a las condiciones de GMP, las pruebas clínicas son factibles y los linfocitos Th17 cultivados pueden permitirse como una nueva forma de terapia celular.

- 40 La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos Th17 purificados, solos o con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas o los métodos de tratamiento se pueden administrar en combinación con otros tratamientos terapéuticos, tales como agentes quimioterapéuticos y/o agentes antimicrobianos, o vacunas.

- 45 La cantidad de linfocitos Th17 purificados eficaces en el tratamiento de un trastorno o afección particular depende de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, se pueden emplear ensayos para identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno y se decidirá de acuerdo con el juicio del médico encargado y las circunstancias de cada sujeto. Las dosis eficaces se 50 pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta procedentes de sistemas de prueba *in vitro* o de modelos animales.

- La divulgación también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas. Opcionalmente asociado con dicho 55 contenedor(es) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación de la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. También se pueden incluir instrucciones para su uso de la composición.

- 60 Aunque la invención se ha desvelado con referencia a realizaciones específicas, es evidente que otros expertos en la materia pueden idear otras realizaciones y variaciones de esta invención. Se pretende que las reivindicaciones adjuntas se interpreten de modo que incluyan todas estas realizaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a un linfocito T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en dicho linfocito T, donde el segundo agente es un anticuerpo anti-ICOS, y que comprende además un agente polarizante de Th17, donde el agente polarizante se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IL-23, anticuerpo anti-IFN γ neutralizante y anticuerpo anti-IL-4 neutralizante.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende una superficie en fase sólida o una línea celular humana.
3. La composición de la reivindicación 2, donde dicha composición comprende una línea celular humana y dicha línea celular humana se selecciona del grupo que consiste en células K562, U937, 721.221, T2 y C1R o dicha célula se modifica genéticamente para expresar un receptor Fc γ humano.
4. La composición de la reivindicación 3, donde la célula se modifica genéticamente para expresar un receptor Fc γ humano y dicho receptor Fc γ se selecciona del grupo que consiste en CD32, CD64, y cualquier combinación de los mismos.
5. La composición de la reivindicación 1, donde dicho primer agente se une a CD3 o a un componente del complejo TCR/CD3.
6. La composición de la reivindicación 3, donde dicha célula se modifica genéticamente para expresar un receptor Fc γ humano y dicha célula se modifica genéticamente de manera adicional para expresar dicho segundo agente.
7. La composición de la reivindicación 6, donde dicha célula se modifica adicionalmente (i) para expresar una citocina o (ii) para expresar una molécula inhibidora que inhibe una citocina que interfiere con el proceso de diferenciación de Th17.
8. La composición de la reivindicación 7(i), donde dicha citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-23 y cualquier combinación de las mismas.
9. La composición de la reivindicación 7(ii), donde dicha citocina que interfiere con la molécula inhibidora que inhibe una citocina que interfiere con el proceso de diferenciación de Th17 se selecciona del grupo que consiste en IFN γ , IL-4, y cualquier combinación de los mismos.
10. Un método *in vitro* para activar o estimular una población de linfocitos T, comprendiendo dicho método: 1) proporcionar una población de células donde al menos una parte de la misma comprende linfocitos T; 2) poner en contacto dicha población de células con una composición que comprende un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a dichos linfocitos T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en dichos linfocitos T, donde el segundo agente es un anticuerpo anti-ICOS, y que comprende además un agente polarizante de Th17, donde el agente polarizante se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IL-23, anticuerpo anti-IFN γ neutralizante y anticuerpo anti-IL-4 neutralizante.
11. El método de la reivindicación 10, donde dicha composición es la composición de la reivindicación 1, y donde dicho agente polarizante de Th17 se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, un anticuerpo anti-IFN γ neutralizante, un anticuerpo anti-IL-4 neutralizante, y cualquier combinación de los mismos.
12. El método de la reivindicación 10, donde dicha composición comprende una superficie en fase sólida o una línea celular humana.
13. El método de la reivindicación 12, donde dicha composición comprende una línea celular humana y dicha línea celular humana se selecciona del grupo que consiste en células K562, U937, 721.221, T2 y C1R o dicha célula se modifica genéticamente para expresar un receptor Fc γ humano.
14. El método de la reivindicación 13, donde dicha célula se modifica genéticamente para expresar un receptor Fc γ humano y dicho receptor Fc γ se selecciona del grupo que consiste en CD32, CD64, y cualquier combinación de los mismos.
15. El método de la reivindicación 10, donde dicho primer agente se une a CD3 o a un componente del complejo TCR/CD3.
16. El método de la reivindicación 12, donde dicha composición comprende una línea celular humana y dicha célula se modifica genéticamente de manera adicional para expresar dicho segundo agente.
17. El método de la reivindicación 16, donde dicha célula se modifica adicionalmente para expresar una citocina.

18. El método de la reivindicación 10, donde dichos linfocitos T son linfocitos T CD4+, linfocitos T de cordón umbilical o linfocitos T periféricos.
19. El método de la reivindicación 10, donde dichos linfocitos T secretan niveles elevados de IL-17A, IL-17F y CCL20 después de al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho rondas de estimulación en comparación con las células coestimuladas con CD28.
20. El método de la reivindicación 19, donde dichos linfocitos T secretan niveles elevados de IFN γ , TNF α e IL-21 en comparación con la coestimulación con CD28.
21. El método de la reivindicación 10, que comprende además poner en contacto dichos linfocitos T con un antígeno.
22. El método de la reivindicación 21, donde dicho antígeno es un antígeno tumoral.
23. Un linfocito T estimulado con ICOS para su uso en un método de inmunoterapia, donde dicho linfocito T estimulado con ICOS se ha puesto en contacto con un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a los linfocitos T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en linfocitos T, donde el segundo agente es un anticuerpo anti-ICOS, y que comprende además un agente polarizante de Th17, donde el agente polarizante se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IL-23, anticuerpo anti-IFN γ neutralizante y anticuerpo anti-IL-4 neutralizante.
24. El linfocito T estimulado con ICOS para su uso como en la reivindicación 23, donde dicho agente polarizante de Th17 se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, un anticuerpo anti-IFN γ neutralizante, un anticuerpo anti-IL-4 neutralizante, y cualquier combinación de los mismos.
25. El linfocito T estimulado con ICOS para su uso como en la reivindicación 23, donde dicho primer agente se une a CD3 o a un componente del complejo TCR/CD3.
26. El linfocito T estimulado con ICOS para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, donde dicho Th17 se ha puesto en contacto con un antígeno.
27. Una población de linfocitos Th17 expandidos cultivados producida por el método como en la reivindicación 10 que exhibe actividad antitumoral, donde dichas células se expanden a un número suficiente para una terapia eficaz en un mamífero.
28. Una composición que comprende un primer agente que es capaz de proporcionar una señal de activación primaria a un linfocito T y un segundo agente que es capaz de activar ICOS en dicho linfocito T, donde el segundo agente es un anticuerpo anti-ICOS, y que comprende además un agente polarizante de Th17, donde el agente polarizante se selecciona del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IL-23, anticuerpo anti-IFN γ neutralizante y anticuerpo anti-IL-4 neutralizante, para su uso en un método de regulación de un linfocito Th17 en un mamífero.

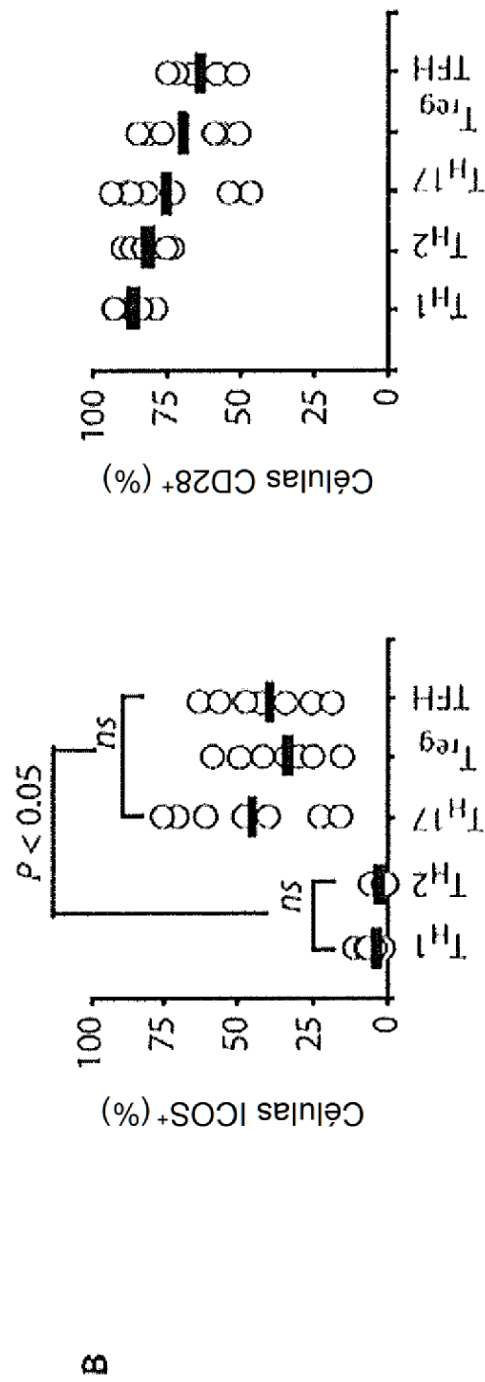
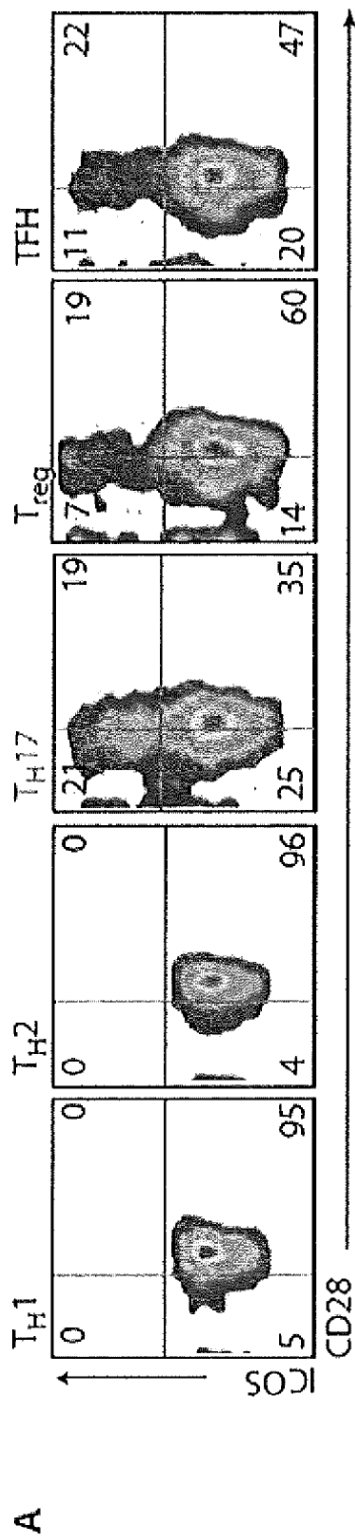


Figura 1

C

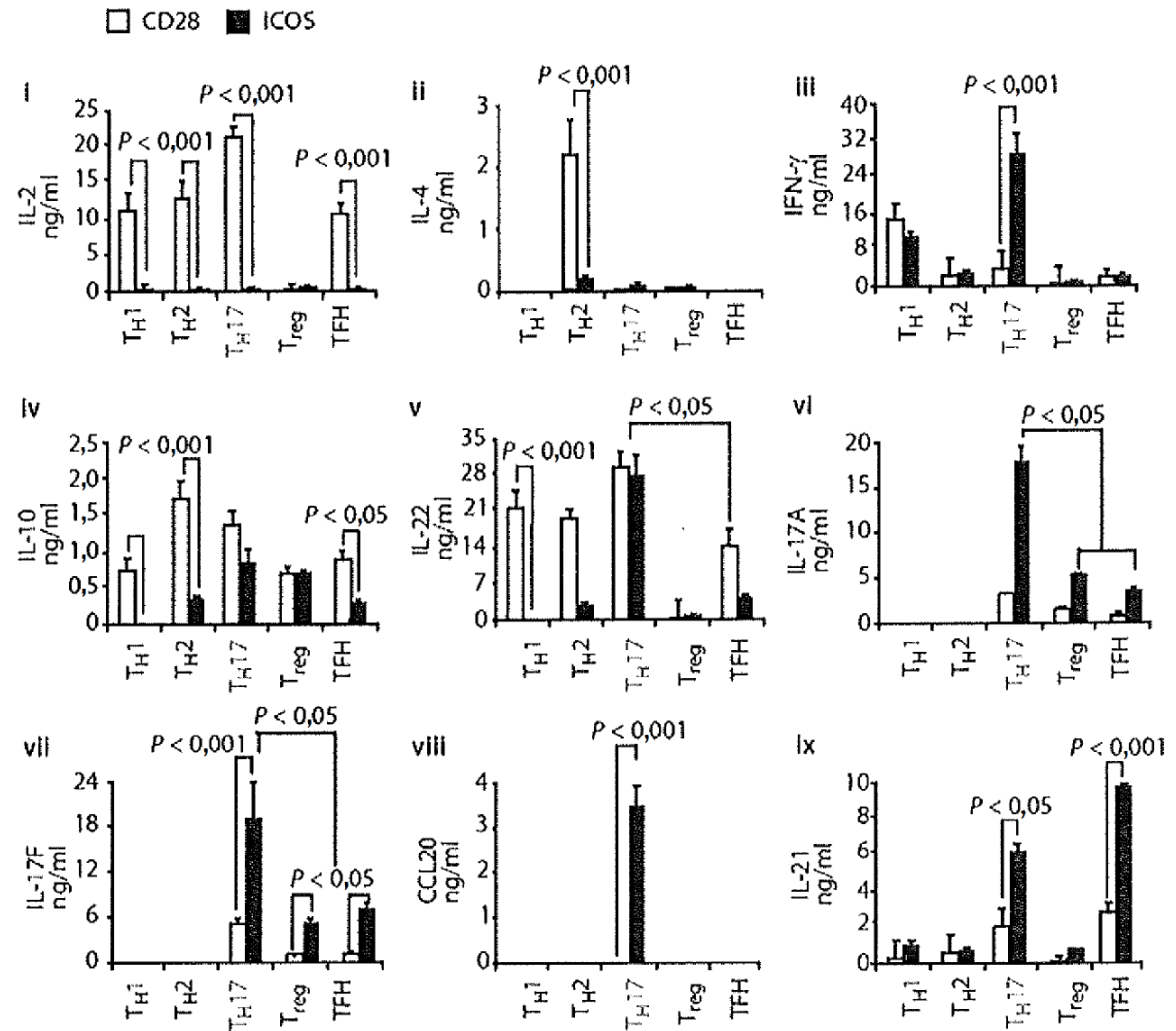


Figura 1

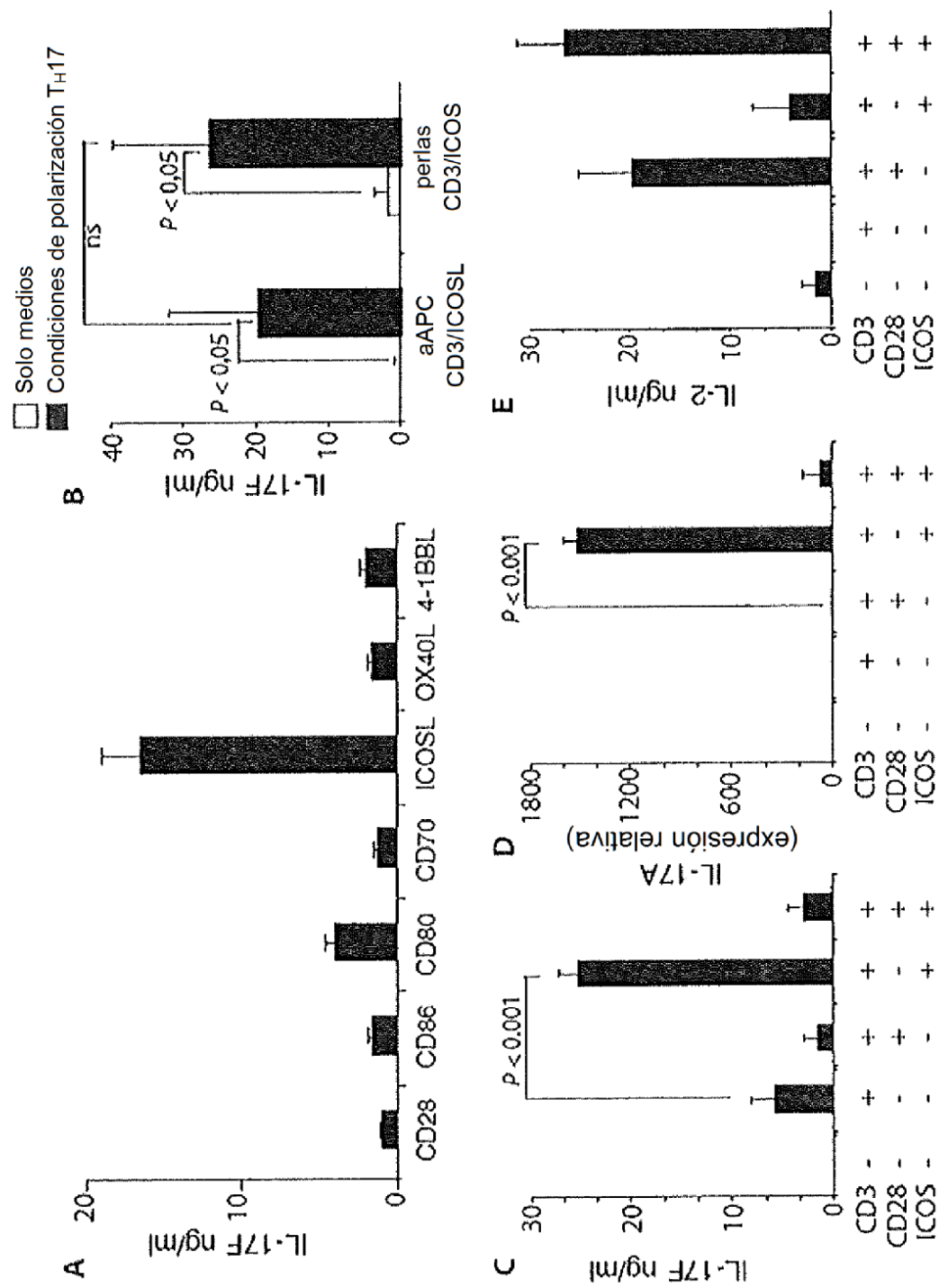


Figura 2

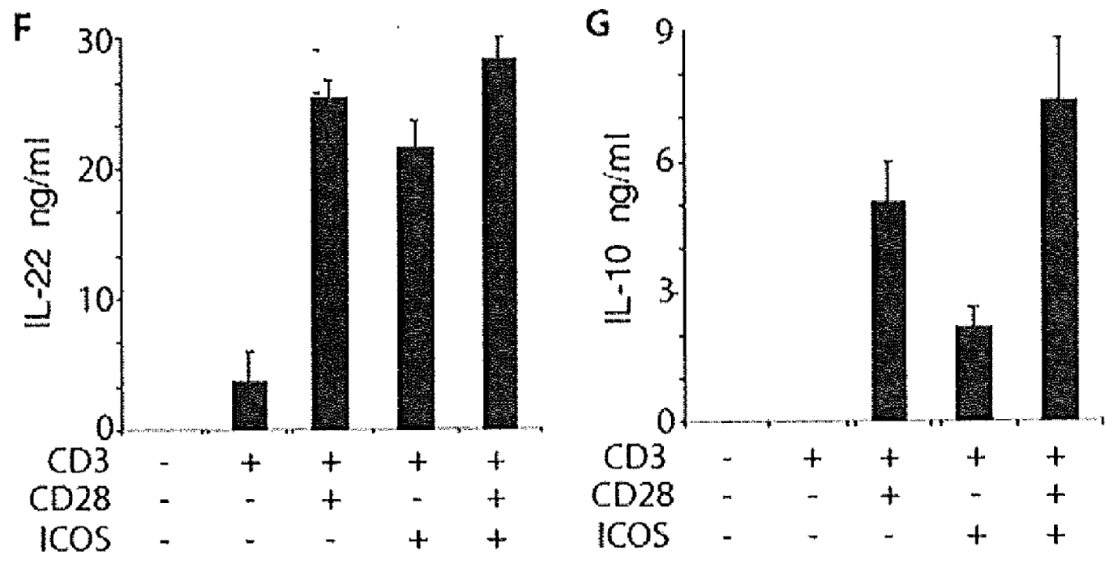


Figura 2

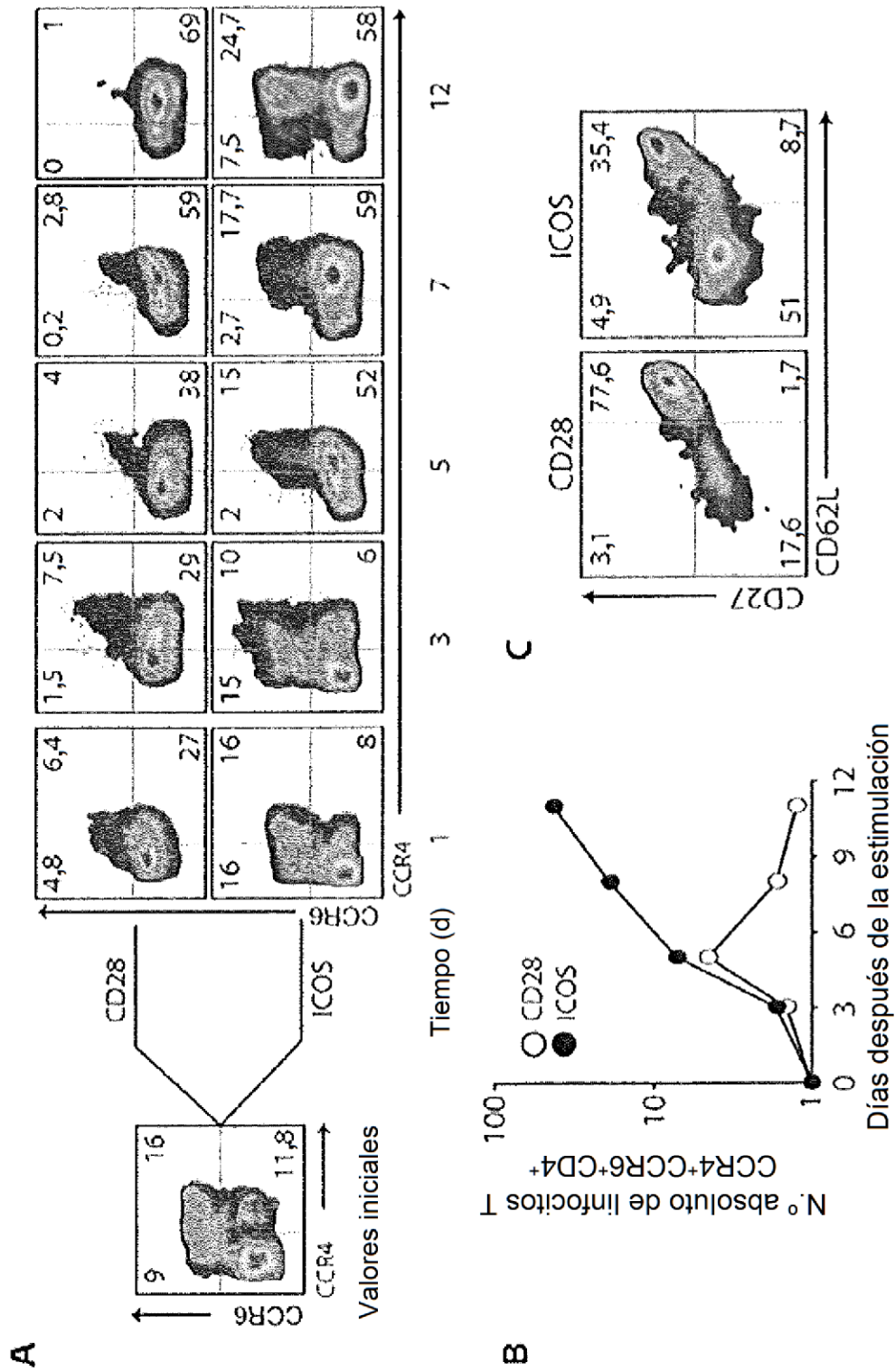


Figura 3

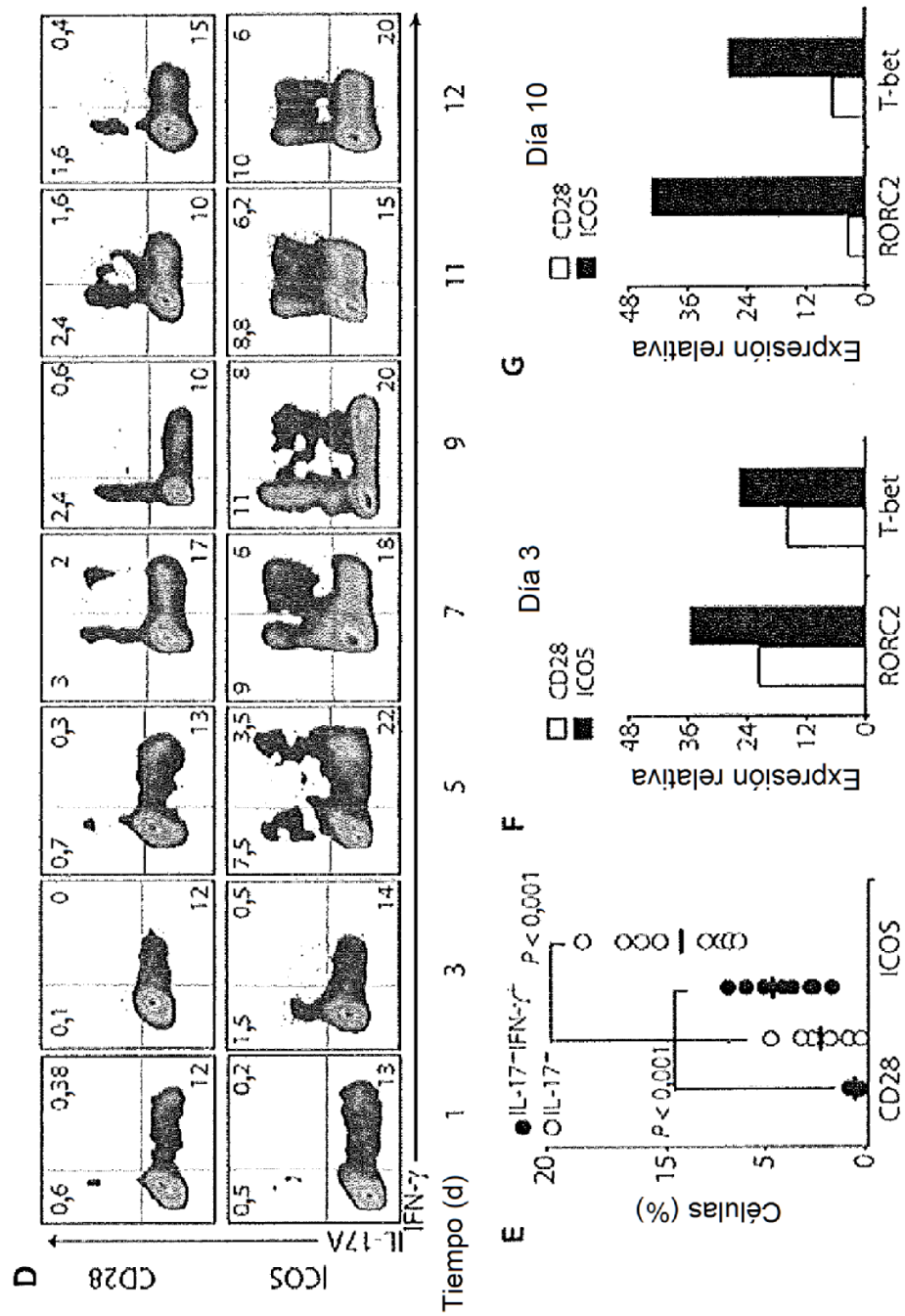


Figura 3

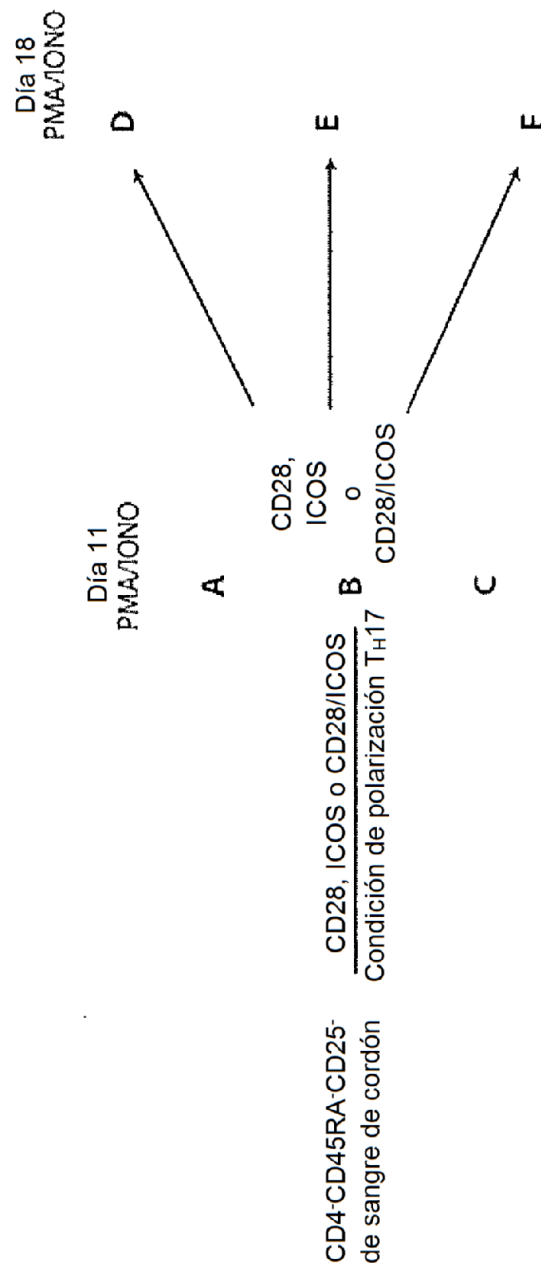


Figura 4

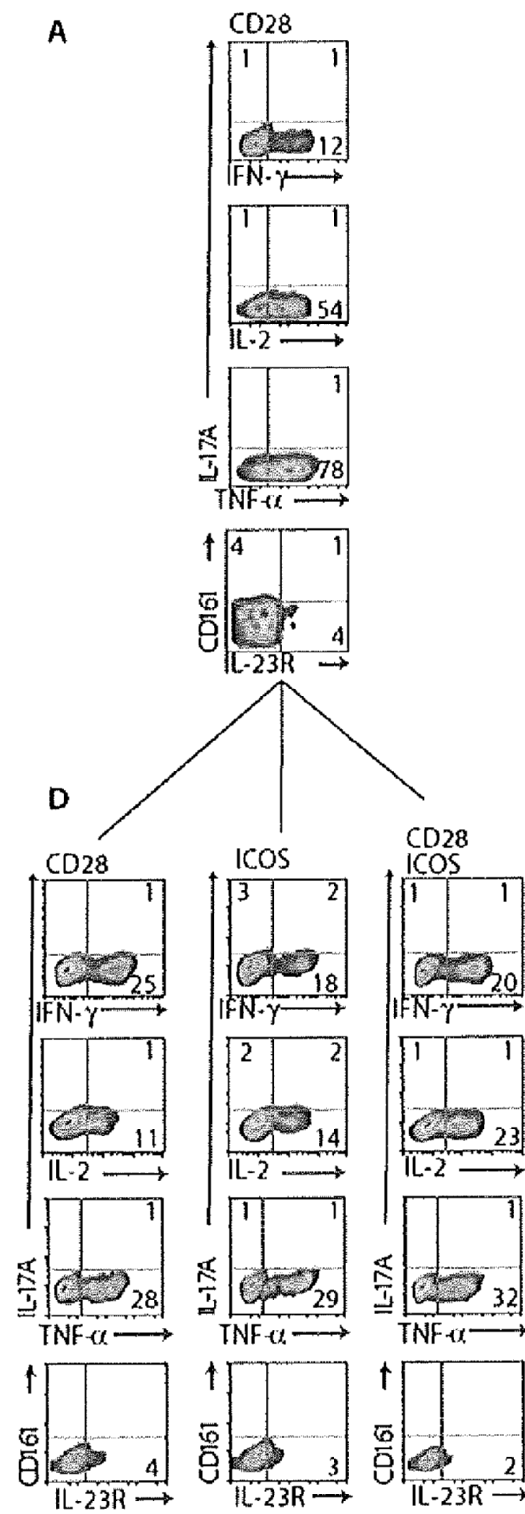


Figura 4

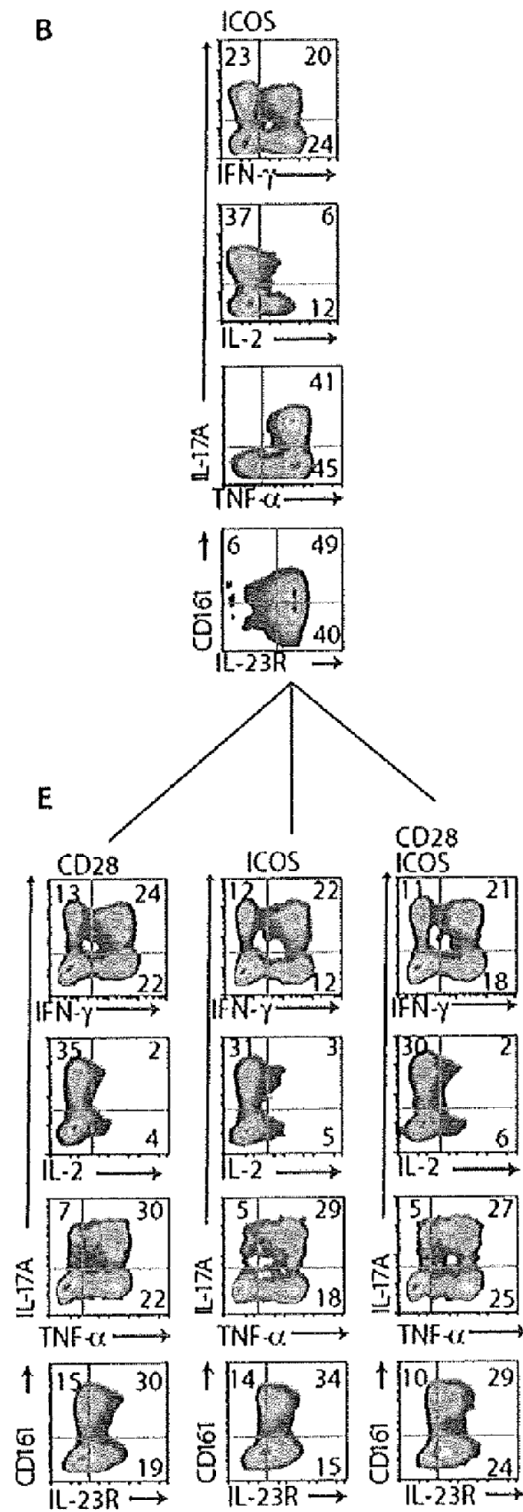


Figura 4

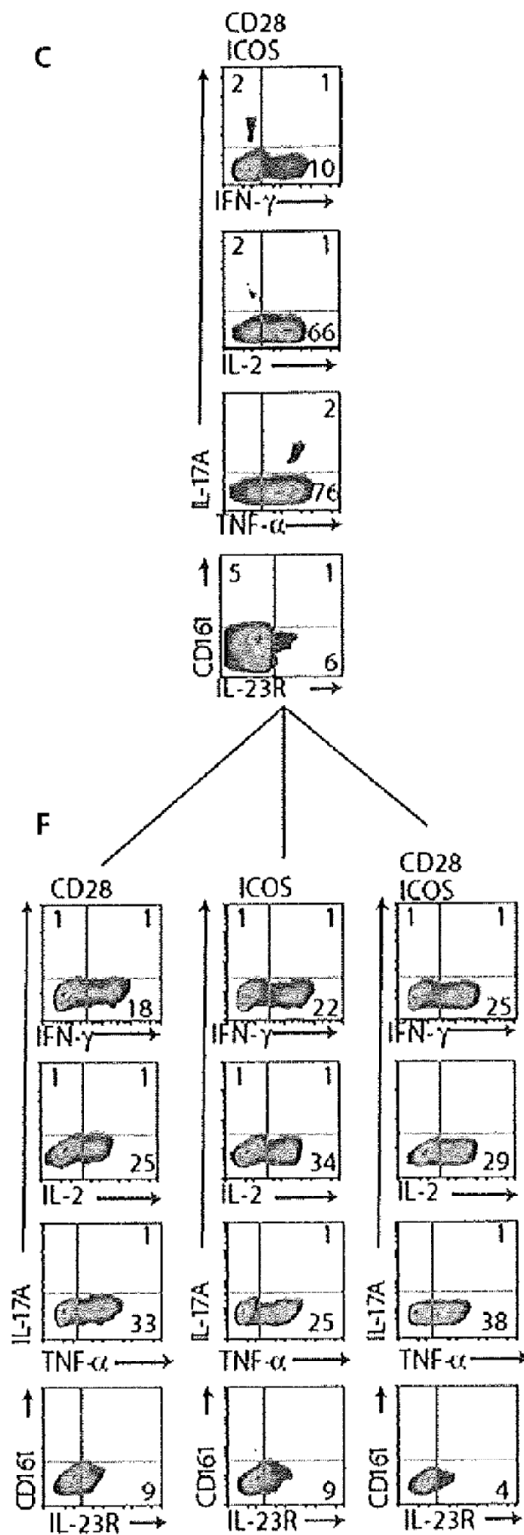


Figura 4

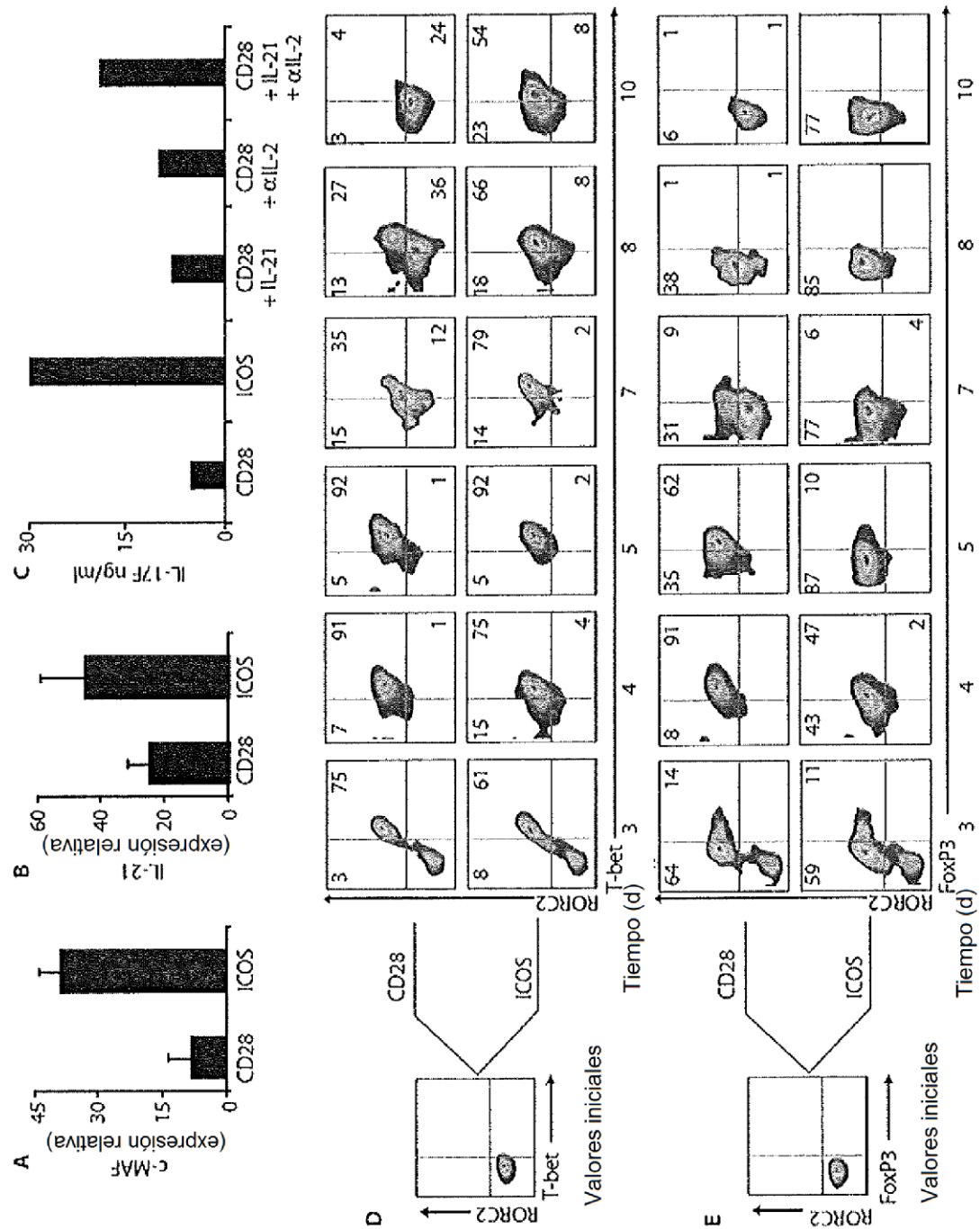


Figura 5

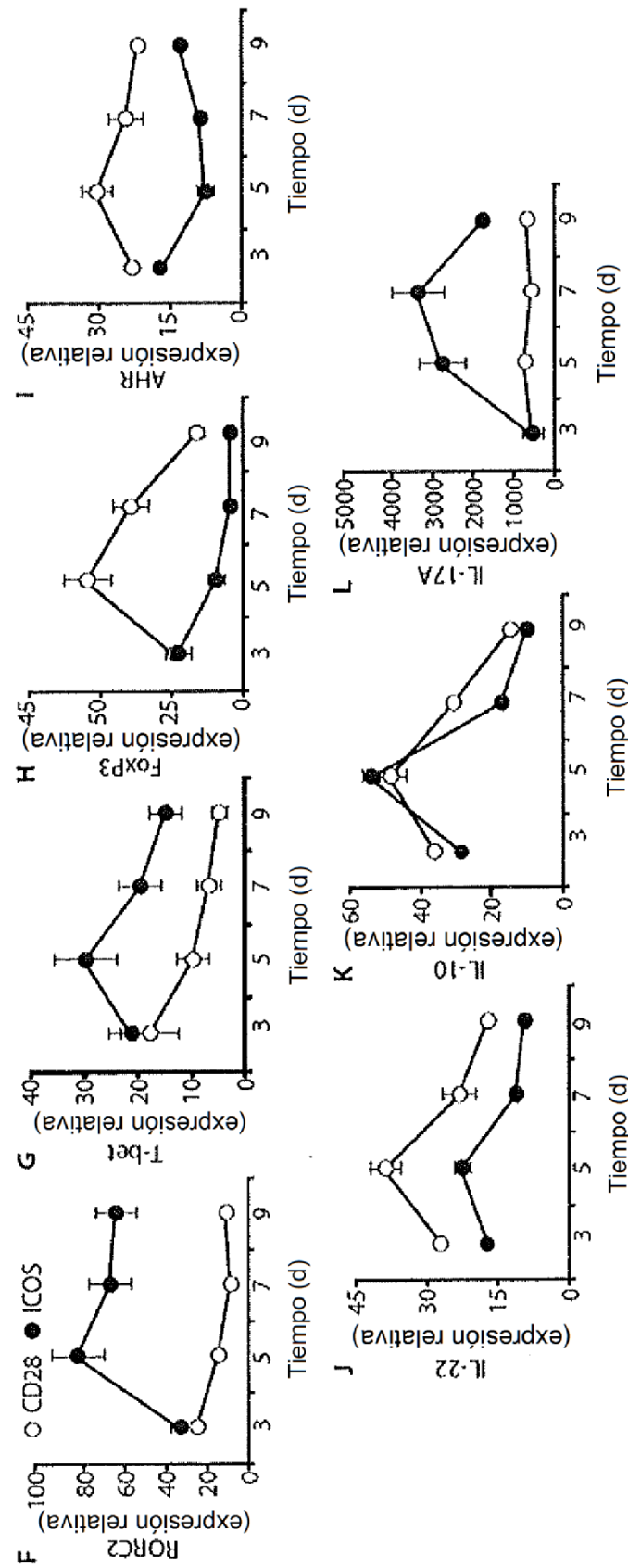


Figura 5

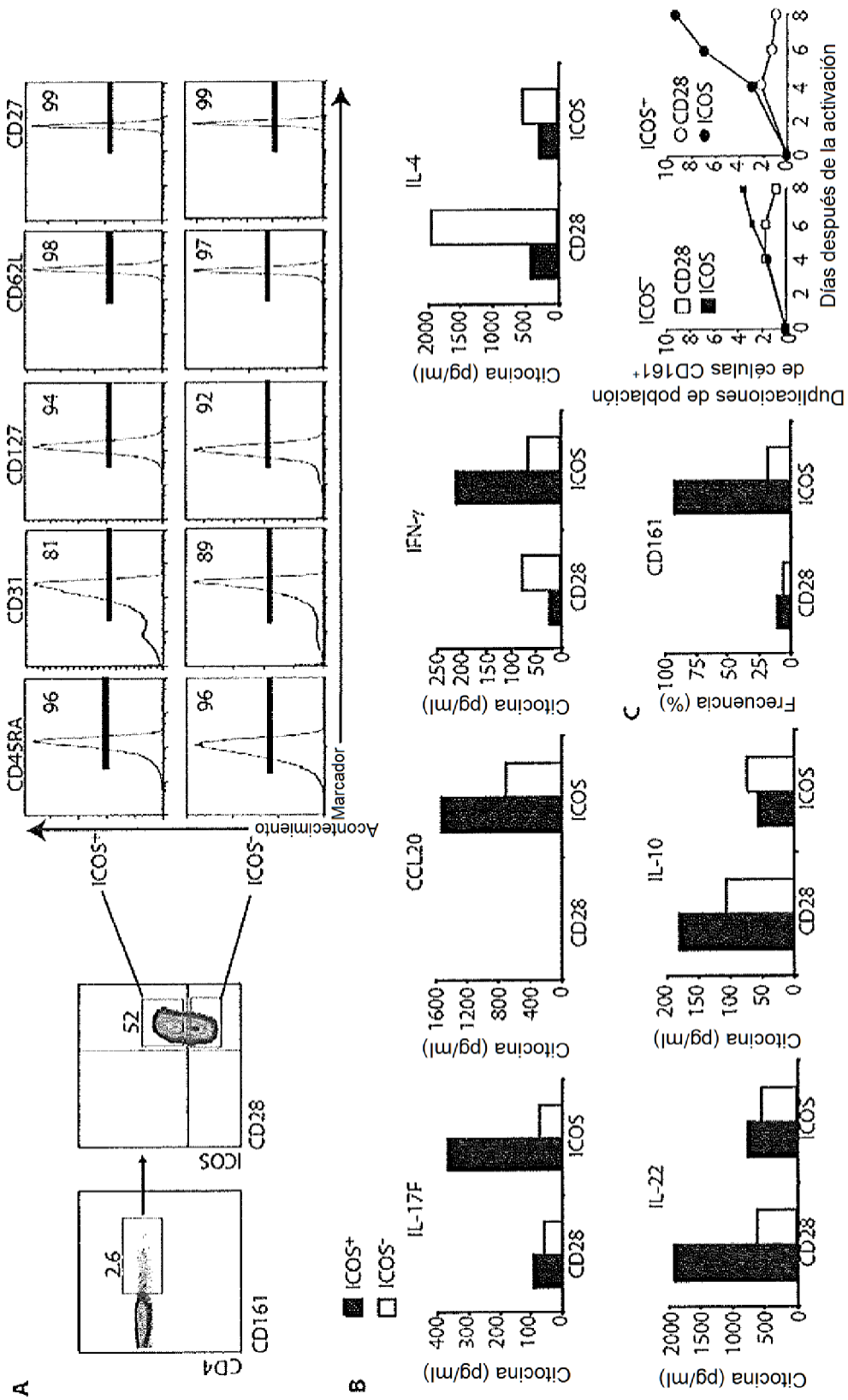


Figura 6

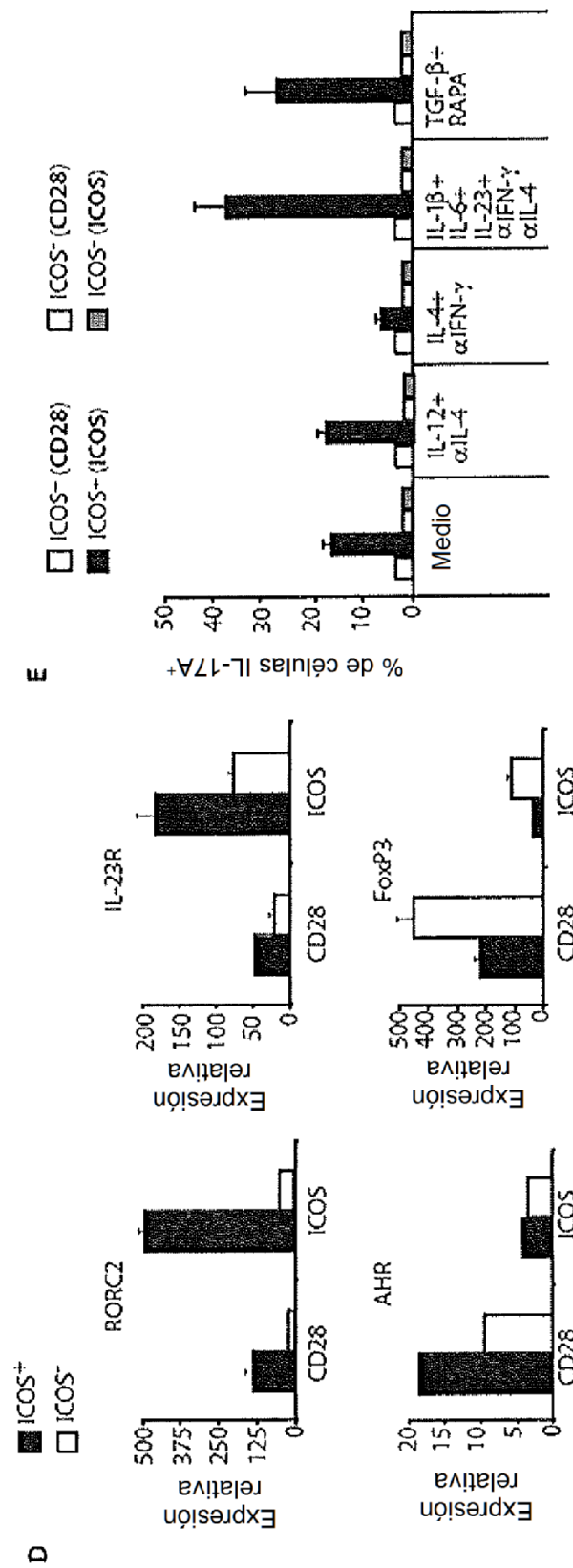


Figura 6

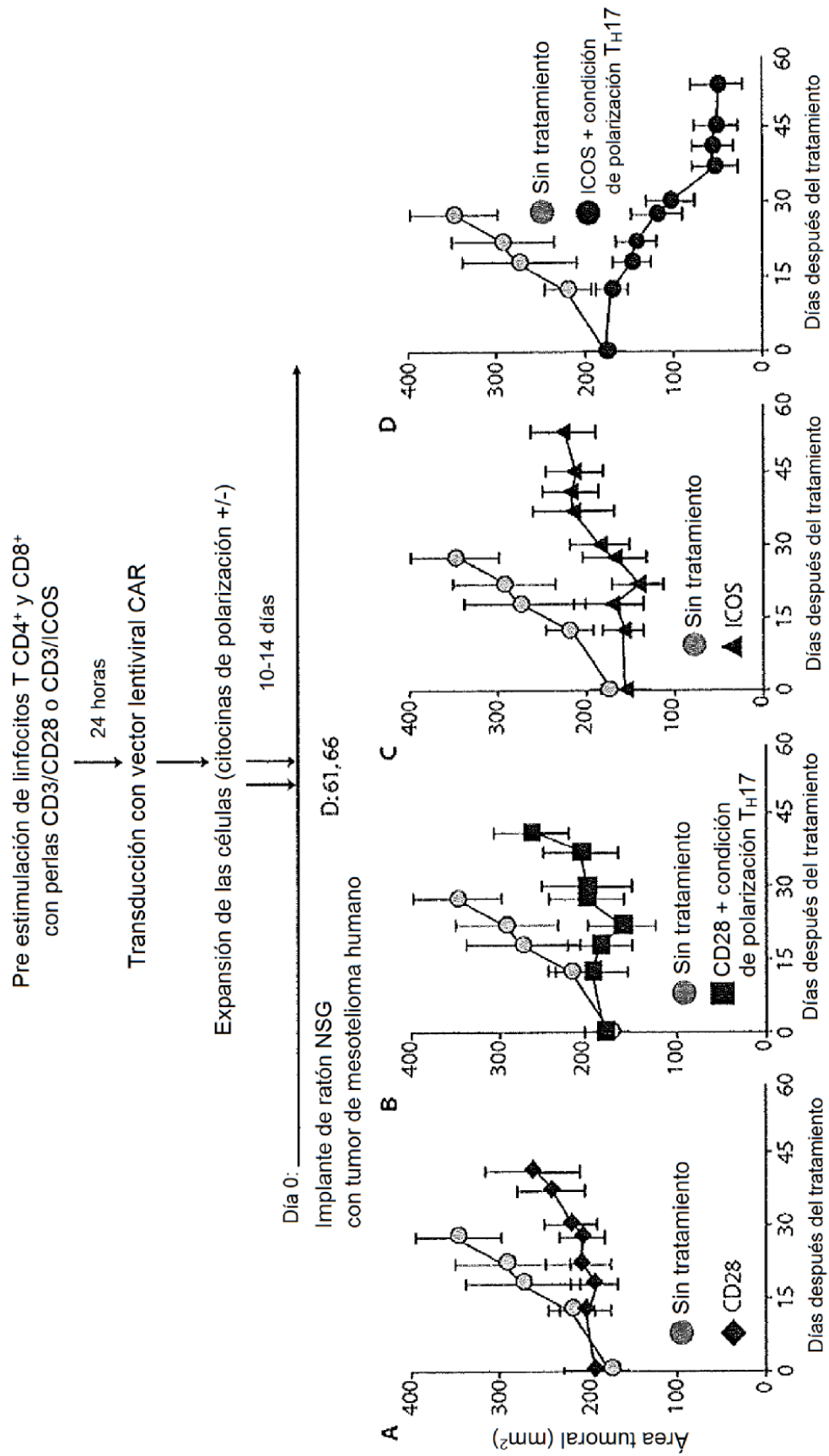


Figura 7

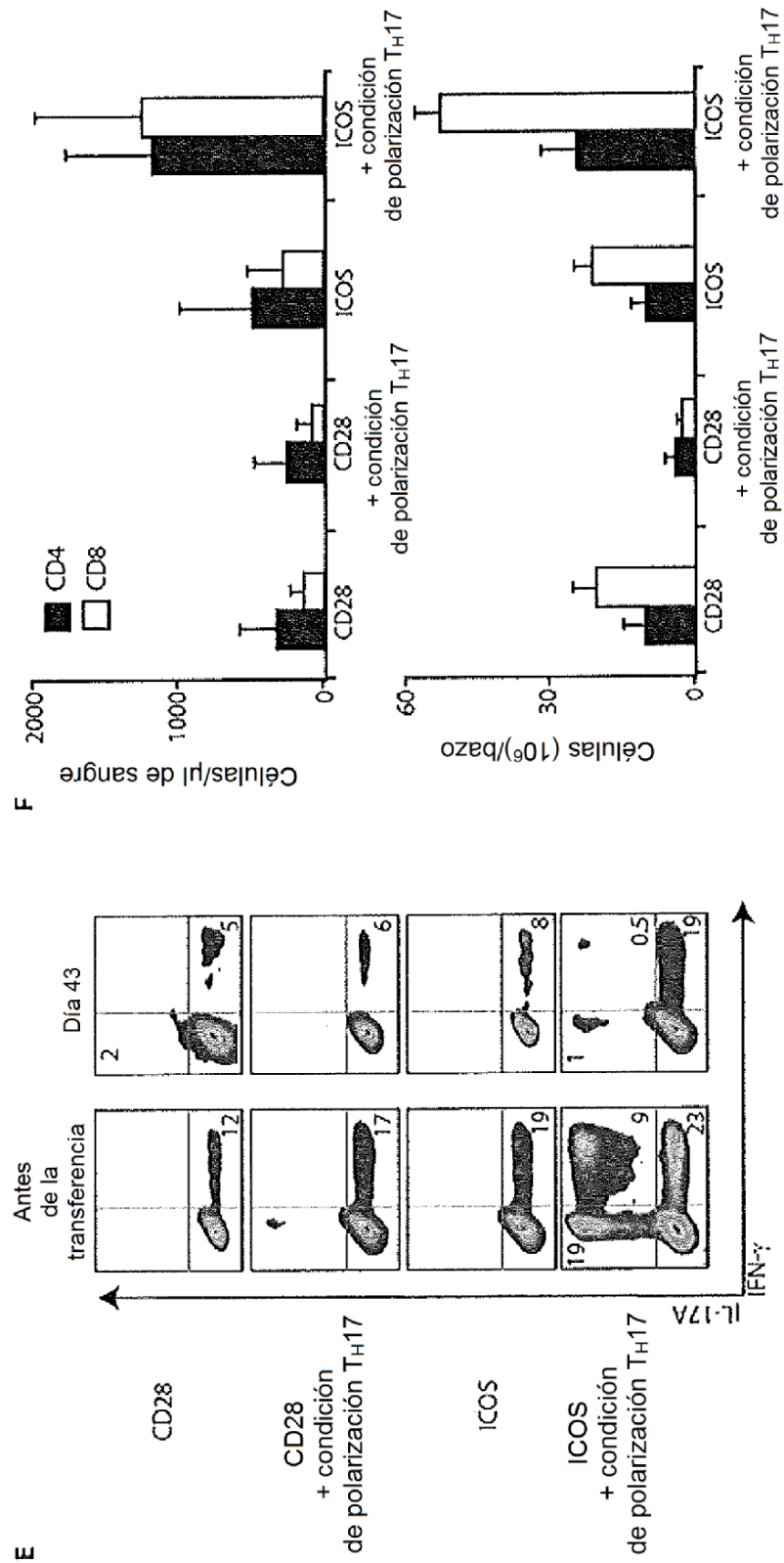


Figura 7

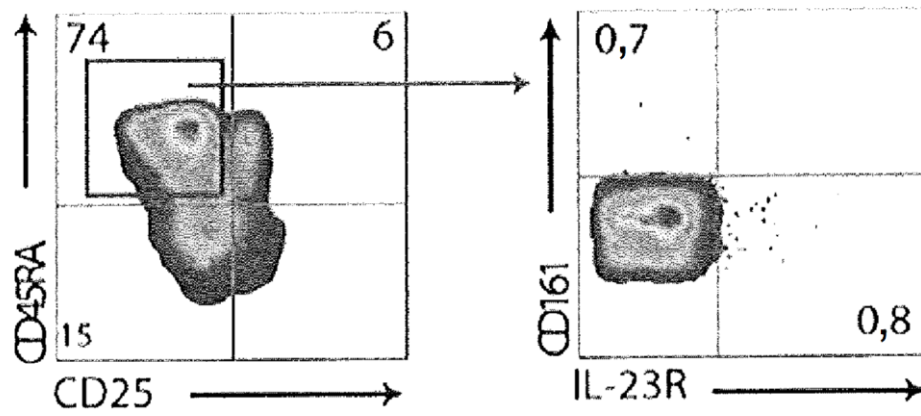


Figura 8

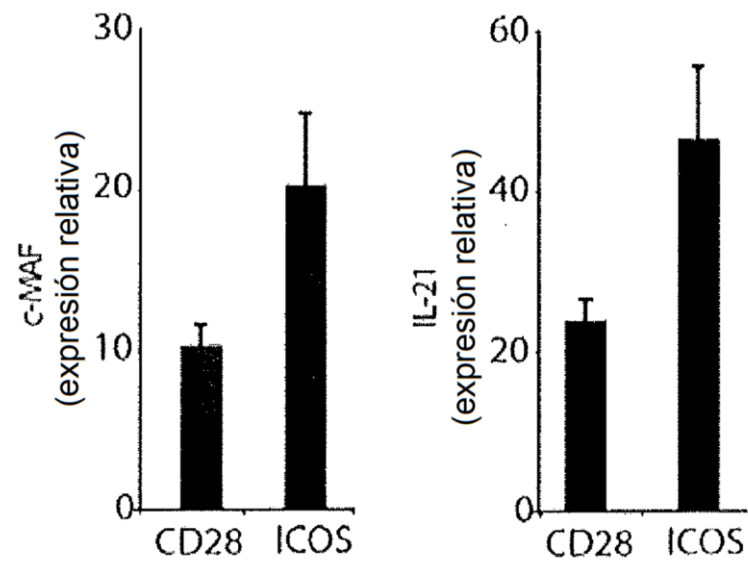


Figura 9

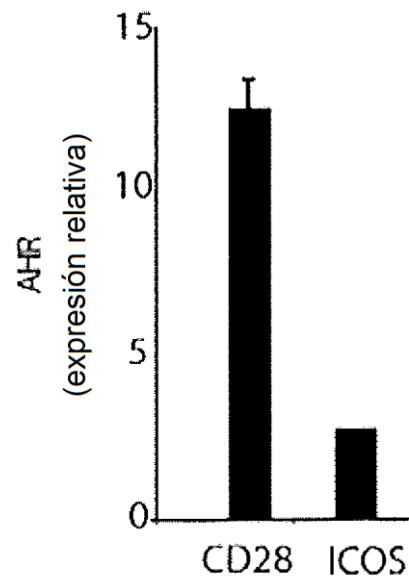


Figura 10

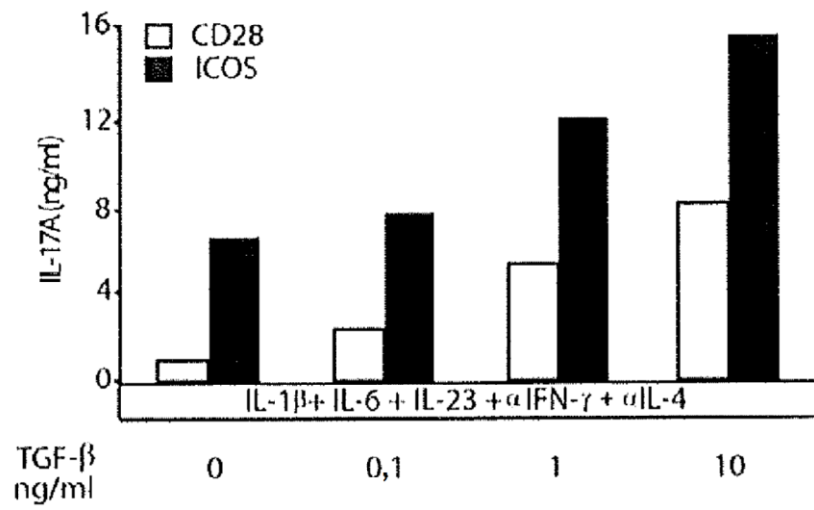


Figura 11

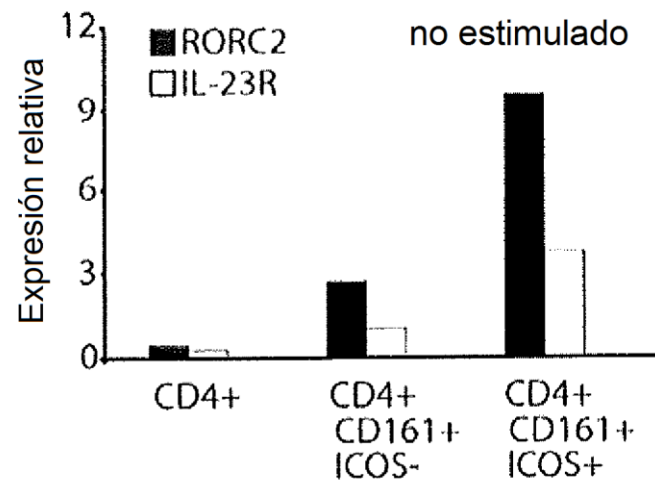


Figura 12

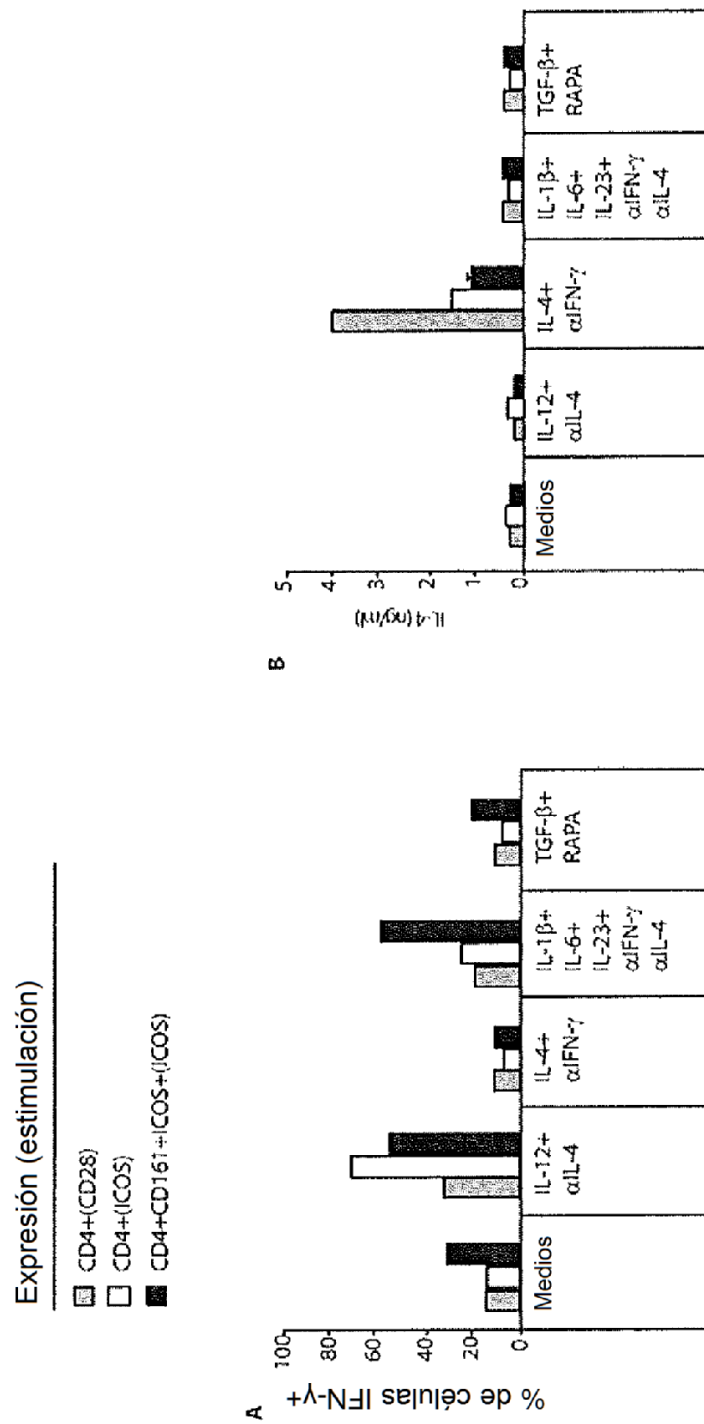


Figura 13

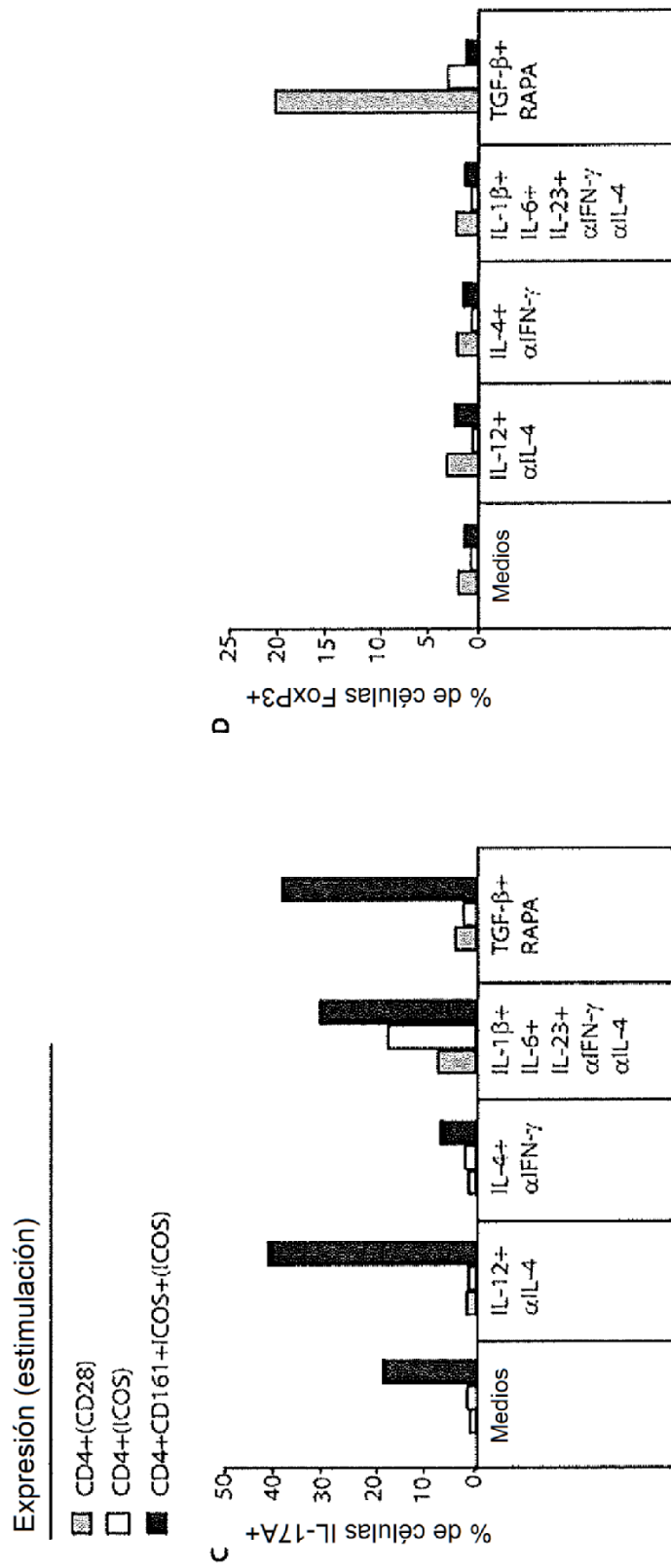


Figura 13