

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 652**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/00** (2006.01)

**A01N 63/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2013 PCT/US2013/025342**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13119947**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013 E 13746524 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2812431**

54 Título: **Mezclas pep para generar CTL multivíricos con amplia especificidad**

30 Prioridad:

**09.02.2012 US 201261596875 P**

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

**17.03.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEEN, ANNE, MARIE;  
VALDES, JUAN, FERNANDO VERA;  
ROONEY, CLIONA, M. y  
GERDEMANN, ULRIKE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 748 652 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

Mezclas pep para generar CTL multivíricos con amplia especificidad

5 **Campo técnico**

La presente invención generalmente se refiere a los campos de inmunología, biología celular, biología molecular y medicina.

10 **Antecedentes de la invención**

Aunque el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT, de sus siglas en inglés) puede curar tumores malignos hematológicos y trastornos genéticos, la extensión a donantes que no sean hermanos compatibles con HLA ha dado como resultado la aparición de infecciones víricas como los principales contribuyentes a la morbilidad y mortalidad después de un trasplante <sup>1-4</sup>. Con el advenimiento de un cribado vírico más intensivo y una detección mejorada, se ha implicado un número creciente de patógenos víricos en estas complicaciones, expandiéndose desde el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein Barr (EBV, de sus siglas en inglés), el virus del herpes simple (HSV, de sus siglas en inglés), el adenovirus (Adv) y BK para incluir el virus del herpes humano (HHV, de sus siglas en inglés)-6, el virus sincitial respiratorio (RSV, de sus siglas en inglés), la paragripe y la gripe <sup>2</sup>. Si bien los agentes farmacológicos son la terapia estándar para algunos, tienen toxicidades sustanciales, generan variantes resistentes, con frecuencia son ineficaces y no brindan protección a largo plazo <sup>5,6</sup>.

La restauración de la inmunidad específica del virus ofrece una alternativa atractiva a los fármacos convencionales. Los inventores han demostrado que los linfocitos T citotóxicos (CTL, de sus siglas en inglés) específicos de virus expandidos *in vitro* generados a partir de donantes de células madre con especificidad para uno (EBV), dos (EBV y Adv) o tres (EBV, CMV y Adv) virus son seguros y eficaces y previenen y tratan la infección vírica o la enfermedad en el contexto de HSCT <sup>7-9</sup>. Más recientemente, los CTL específicos de virus almacenados, parcialmente compatibles con HLA (CTL de terceros) se muestran prometedores en receptores de aloinjertos con enfermedad vírica avanzada <sup>10-12</sup>.

A pesar de estos resultados clínicos alentadores, la implementación más amplia de terapia con linfocitos T está restringida por (i) el espectro limitado de virus que pueden ser dirigidos eficazmente en una sola línea de linfocitos T, y (ii) la logística de fabricación. La competencia antigénica entre linfocitos T de alta y baja frecuencia, así como entre múltiples antígenos expresados en diferentes niveles y la competencia por la presentación en células presentadoras de antígenos (APC, de sus siglas en inglés) compartidas puede favorecer la generación de líneas dominadas mediante respuestas a un solo virus o a un espectro restringido de antígenos víricos <sup>13,14</sup> limitando así la cobertura antiviral proporcionada por un solo producto de linfocitos T. Además, el proceso de fabricación actual es complejo, requiere material de virus infeccioso (EBV/Adv), producción de un vector de grado clínico y cultivo *in vitro* prolongado (10-12 semanas) <sup>8-10,15</sup>. Para abordar este último problema, algunos grupos han evaluado enfoques más rápidos para producir productos de linfocitos T para la transferencia adoptiva. Estos incluyen la selección streptamer para aislar directamente los linfocitos T CD8+ específicos del virus de la sangre periférica <sup>16</sup>, así como la selección de células basadas en la producción de citocinas (IFN) o la expresión de marcadores de activación (por ejemplo, CD154) después de la exposición al antígeno <sup>17-19</sup>. Sin embargo, estos enfoques son caros, requieren un gran volumen de sangre inicial, que no siempre está disponible, particularmente en el contexto de donantes no relacionados, y no puede aplicarse a virus con bajas frecuencias de precursores de linfocitos T circulantes.

Existe una necesidad en la materia de un mecanismo por el cual se pueda generar rápidamente una sola preparación de CTL policlonales que sea consistentemente específica para antígenos inmunodominantes y/o subdominantes procedentes de más de un virus, incluidos aquellos que son causas frecuentes de enfermedad o muerte después de un trasplante, por ejemplo.

50 **Breve resumen de la invención**

En el presente documento, se describen métodos y composiciones que se refieren a componentes del sistema inmunitario que se modifican para reconocer inmunogénicamente dianas particulares. Algunos aspectos descritos en el presente documento se refieren al desarrollo de linfocitos T citotóxicos (CTL) que se dirigen a una fracción biológica que provoca una respuesta inmunitaria en un individuo. Los aspectos específicos descritos en el presente documento se refieren al desarrollo de CTL que se dirigen a, al menos, un antígeno de un patógeno (incluyendo virus, bacterias u hongos) u otro antígeno asociado a una enfermedad. Determinados aspectos descritos en el presente documento se refieren al desarrollo de CTL que se dirigen a antígenos de al menos un virus, por ejemplo. Aspectos alternativos descritos en el presente documento se refieren al desarrollo de CTL que se dirigen a, al menos, un antígeno tumoral, por ejemplo. En al menos algunos casos, los CTL se dirigen a antígenos de dos o más virus (o dos o más tumores, en los aspectos alternativos descritos en el presente documento). En algunas realizaciones, los CTL se dirigen a uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más antígenos del mismo virus. En algunas realizaciones, los CTL se dirigen a un antígeno de más de un virus. En determinadas realizaciones, los CTL se dirigen a uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más antígenos de diferentes virus.

En particular, la invención proporciona un método para generar linfocitos T citotóxicos (CTL) que se dirigen a, al menos,

un antígeno de dos o más virus, que comprende las etapas de poner en contacto las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, de sus siglas en inglés) con al menos dos bibliotecas de péptidos, comprendiendo cada una de dichas bibliotecas de péptidos, péptidos que se superponen en secuencia para abarcar parte o la totalidad de un antígeno vírico y que tienen al menos siete aminoácidos de longitud; y expandir la cantidad de linfocitos T específicos de virus en presencia de una o más citocinas, en donde (a) uno de los virus es el virus BK y el antígeno se selecciona de LT y VP-1; o (b) uno de los virus es HHV6 y el antígeno se selecciona de U14, U11, U71, U54 y U90; o (c) uno de los virus es RSV y el antígeno se selecciona de N y F; o (d) uno de los virus es el virus de la gripe y el antígeno se selecciona de MP1 y NP1; y en donde el método se realiza en ausencia de células dendríticas pulsadas por péptidos aisladas.

La presente divulgación proporciona mejoras significativas y no obvias en los métodos para generar líneas de CTL con especificidad contra múltiples antígenos tumorales o múltiples virus (por ejemplo). En la generación de CTL con tal especificidad, los métodos descritos en el presente documento evitan la necesidad de células dendríticas en la preparación de dichas líneas. En algunos casos, el antígeno se presenta a las PBMC en forma de uno o más péptidos que abarcan parte o la totalidad del antígeno. Los péptidos antigénicos pueden proporcionarse a las PBMC en una biblioteca de mezclas de péptidos, que pueden denominarse mezclas pep. En otros aspectos descritos en el presente documento, en la preparación de los CTL, el método descrito en el presente documento, permite la combinación de una variedad de mezclas pep. En algunos casos, la colección de antígenos puede incluir tanto antígenos inmunodominantes como subdominantes, sin embargo, a pesar de la presencia de antígenos inmunodominantes en la colección con antígenos subdominantes, sorprendentemente se generan antígenos subdominantes que incluyen antígenos específicos de CTL.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, un individuo necesita los métodos y/o composiciones descritos en el presente documento. En aspectos específicos descritos en el presente documento, el individuo está inmunocomprometido (que, por ejemplo, puede definirse como un individuo cuya capacidad para combatir enfermedades infecciosas o cáncer con el sistema inmunitario está comprometida o completamente ausente). En aspectos específicos descritos en el presente documento, el individuo inmunocomprometido ha tenido un trasplante de células madre, ha recibido un trasplante de órganos y/o ha recibido uno o más tratamientos contra el cáncer, que incluyen quimioterapia o radiación, por ejemplo. En algunos casos, el individuo adquirió o heredó el trastorno de inmunodeficiencia. En algunos aspectos descritos en el presente documento, se proporcionan métodos y/o composiciones descritos en el presente documento a los que están inmunocomprometidos por su enfermedad y/o su tratamiento.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, existe un mecanismo por el cual se puede generar rápidamente una sola preparación de CTL policlonales (por ejemplo, CD4+ y CD8+) que son consistentemente específicos para una variedad de antígenos inmunodominantes y/o subdominantes procedentes de uno o más virus (por ejemplo, EBV, CMV, Adv, virus BK, HHV6, RSV y el virus de la gripe) que son causas frecuentes de enfermedad o muerte después de un trasplante. Estos aspectos se adaptan fácilmente a la implementación clínica y es útil como un agente antivírico de amplio espectro "comercial". Estos aspectos utilizan péptidos estandarizados (sintéticos) como estímulo y mejora de las citocinas para promover la supervivencia y expansión de linfocitos T, son fácilmente adaptables a la implementación clínica y son útiles como agentes antivíricos de amplio espectro seguros y eficaces para todos los receptores de trasplantes de alto riesgo, por ejemplo.

En algunas realizaciones de la invención, existe un método para generar linfocitos T citotóxicos (CTL) que se dirigen a, al menos, un antígeno de dos o más virus, que comprende las etapas de: poner en contacto una pluralidad de células mononucleares de sangre periférica con al menos dos bibliotecas de péptidos, comprendiendo cada una de dichas bibliotecas de péptidos, péptidos que se superponen en secuencia para abarcar parte o la totalidad de un antígeno vírico y que tienen al menos siete aminoácidos de longitud; y expandir la cantidad de linfocitos T específicos de virus en presencia de una o más citocinas; en donde (a) uno de los virus es el virus BK y el antígeno se selecciona de LT y VP-1; o (b) uno de los virus es HHV6 y el antígeno se selecciona de U14, U11, U71, U54 y U90; o (c) uno de los virus es RSV y el antígeno se selecciona de N y F; o (d) uno de los virus es el virus de la gripe y el antígeno se selecciona de MP1 y NP1; y en donde el método se realiza en ausencia de células dendríticas pulsadas por péptidos aisladas. En determinadas realizaciones, la una o más citocinas se seleccionan del grupo que consiste en IL4, IL7 y una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, los péptidos se definen además como péptidos que se superponen en secuencia para abarcar parte o la totalidad de un antígeno vírico. Por ejemplo, en determinados aspectos, los péptidos se superponen con al menos tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos, y en algunas realizaciones los péptidos tienen al menos seis, siete u ocho o más aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, los virus dirigidos por los mecanismos descritos en el presente documento se seleccionan del grupo que consiste en EBV, CMV, adenovirus, virus BK, HHV6, VRS, virus de la gripe, virus de la paragripe, bocavirus, coronavirus, LCMV, paperas, sarampión, metapneumovirus, parvovirus B, rotavirus, virus del Nilo occidental, JC, HHV7, y una combinación de los mismos. En aspectos específicos, el virus es EBV y el antígeno se selecciona del grupo que consiste en EBNA1, LMP2 y BZLF1. En aspectos específicos, el virus es CMV y el antígeno se selecciona del grupo que consiste en IE1 y pp65. En casos específicos, el virus es Adv y el antígeno se selecciona del grupo que consiste en Hexon y Penton. En algunas realizaciones, el virus es virus BK y el antígeno se selecciona del grupo que consiste en LT y VP-1. En algunas realizaciones, el virus es HHV6 y el antígeno

se selecciona del grupo que consiste en U14 y U90. En aspectos específicos, el virus es RSV y el antígeno se selecciona del grupo que consiste en N y F. En determinadas realizaciones, el virus es el virus de la gripe y el antígeno se selecciona del grupo que consiste en MP1 y NP1.

5 Los CTL generados por el método de la invención pueden administrarse a un individuo, por ejemplo, un individuo inmunocomprometido. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona CTL que se dirigen a, al menos, un antígeno de dos o más virus para su uso en un método de tratamiento de enfermedades en un individuo, comprendiendo el método generar los CTL usando un método de la invención y administrar los CTL a dicho individuo. En algunos casos, el individuo ha tenido un trasplante alogénico de células madre. En realizaciones específicas, las células se administran mediante inyección, tal como inyección intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, etc., por ejemplo. En algunas realizaciones, el individuo tiene linfoma o leucemia. En algunas realizaciones, los CTL se definen además como CTL policlonales CD4+ y CD8+. Las PBMC pueden ser alogénicas para el individuo o son autólogas para el individuo. En algunos aspectos descritos en el presente documento, los métodos de la invención comprenden además la etapa de exponer los CTL a una o más composiciones que estimulan la división celular, tal como fitohemaglutinina; en algunos aspectos, el compuesto es un mitógeno.

### Breve descripción de los dibujos

20 Para una comprensión más completa de la presente divulgación, ahora se hace referencia a las siguientes descripciones tomadas junto con el dibujo adjunto, en el que:

FIG. 1: Las citocinas que promueven el crecimiento mejoran la activación y expansión de los CTL específicos de antígeno. Las PB-MC se estimularon con mezcla pep pp65 en presencia de IL2, IL15, IL4+7 o sin citocinas exógenas. La expansión celular se evaluó después de 9-11 días de cultivo mediante recuento celular usando exclusión con azul de tripano (n = 5). Los resultados se muestran como números medios de células +/- EEM. (A). Panel B Proliferación de linfocitos T CD3+ en las diferentes condiciones de cultivo evaluadas mediante dilución con CFSE. M1 muestra el porcentaje de células que se sometieron al menos a 7 duplicaciones de células el día 10 después de la estimulación. Los cultivos a granel se analizaron para la expresión del marcador de linfocitos T y NK en el día 10 después de la activación. La expresión media +/- EEM en líneas de CTL generadas a partir de 5 donantes se muestra en el Panel C. El Panel D muestra la producción de citocinas a partir de CTL CD3/CD4+ (auxiliares) y CD3/CD8+ (citotóxicos) el día 9 después del inicio en un donante representativo (los gráficos de puntos mostrados se seleccionaron por células CD3+). Los resultados resumidos de la producción de citocinas intracelulares de tres donantes (media +/- DT) se muestran en el Panel E. Finalmente, se evaluó el perfil de producción de citocinas de CTL específicos de pp65 iniciados con o sin citocinas mediante un ensayo multiplex usando sobrenadante cosechado 18 h después de la reestimulación antigénica (n = 4). Las citocinas Th1 se muestran en el panel izquierdo, mientras que las citocinas Th2 prototípicas se muestran en el panel derecho (Panel F). La presencia de linfocitos T reguladores se evaluó mediante tinción de FoxP3. Los gráficos mostrados se seleccionan por CTL CD3+/CD4+ (Panel G).

FIG. 2: Los CTL estimulados con péptidos y activados con plásmidos comparten características fenotípicas y funcionales similares. Los CTL del panel A se estimularon directamente con una mezcla pep pp65 o usando CD nucleofecionadas con un plásmido de ADN que codifica el mismo antígeno. La expansión celular se evaluó mediante el recuento usando exclusión de azul de tripano (n = 4). El panel B muestra la expresión de marcadores de la superficie celular (promedio +/- expresión de DT) en CTL 11 días después de la estimulación (n = 4). IFN ELISpot evaluó la amplitud de la reactividad de los linfocitos T en CTL específicos de pp65 activados por plásmido y mezcla pep en el día 9 usando un total de 22 mini agrupaciones de péptidos que representan todos los péptidos pp65. Los datos se normalizaron al 100 % para el número máximo de SFC por  $1 \times 10^5$  CTL. (Panel C). El panel D muestra la avidéz de TCR de CTL activado por plásmido frente a la mezcla pep generada a partir de 2 donantes representativos. Para evaluar la avidéz, los pp65-CTL se estimularon con diluciones en serie de mezcla pep pp65 (pp65) o péptidos con epítomos relevantes (coincidentes con HLA) (NLV, QAD). La liberación de IFN de CTL estimulados se evaluó mediante el ensayo ELISpot y las células SFC/ $1 \times 10^5$  máximas se normalizaron al 100 % para fines de comparación.

FIG. 3: La longitud del péptido no afecta la amplitud de la reactividad. El panel A muestra un esquema de tres bibliotecas de péptidos que abarcan una porción de Adv-Hexon que se usaron para el inicio de CTL. Las bibliotecas de péptidos consistieron en péptidos de 15aa, 20aa o 30aa que cubren el 414aa C-terminal inmunogénico de Adv-Hexon. B Análisis fenotípico de CTL realizado el día 10 después de la estimulación (n = 6). Los resultados se muestran como media +/- EEM. Se probó la amplitud de la reactividad utilizando IFN $\gamma$  ELISpot como una lectura, con la biblioteca de péptidos superpuestos Hexon de 15mer dividida en minigrupos, de modo que cada grupo contenía 5-6 péptidos contiguos, como estímulo.

FIG. 4: Las líneas de CTL específicas de antiviral activadas por mezclas pep muestran una especificidad similar a los linfocitos T activados por plásmidos. Las líneas de CTL se generaron usando CD nucleofecionadas con plásmidos de ADN que codifican EBNA-1, LMP2, BZLF-1 (EBV), Hexon, Penton (Adenovirus), IE-1 y pp65 (CMV) o estimulación directa de PBMC con las correspondientes mezclas pep. La especificidad se determinó 10 días después del inicio con IFN ELISpot como lectura. Los resultados se expresan como células de entrada SFC/ $1 \times 10^5$ .

El control fue la liberación de IFN en respuesta a la estimulación con mezcla pep irrelevante.

FIG. 5: Generación de CTL específicos de antivirales. El panel A muestra un esquema de la estrategia de agrupación de antígenos para el inicio de CTL. Las PBMC se estimularon con mezclas pep agrupadas por virus (A), divididos en subgrupos: inmunodominantes y subdominantes (B), divididos en subgrupos que abarcaban antígenos de virus latentes o líticos (C), y finalmente todos los antígenos se agruparon juntos en una mezcla maestra (D). Después de la activación, se agruparon las PBMC y se transfirieron al G-Rex10 ( $15 \times 10^6$ /G-Rex). Después de 10 días, se analizó la especificidad de las líneas CTL generadas usando estas 4 estrategias de agrupación que utilizan el ensayo IFN ELIspot como lectura y las mezclas pep individuales como estímulo. Los resultados de 2 donantes representativos se presentan en el Panel B que no muestran diferencias en la especificidad de las líneas. El Panel C confirma que el CTL multiviral se puede generar de forma reproducible mediante la agrupación de todas las mezclas pep en una mezcla maestra para la activación ( $n = 8$ ). Los resultados se expresan como células de entrada SFC/ $1 \times 10^5$  +/- EEM. El control fue la liberación de IFN en respuesta a la estimulación con una mezcla pep irrelevante. La especificidad antigénica de los linfocitos T CD3/CD8+ (citotóxicos) y CD3/CD8- (auxiliares) se evaluó mediante tinción intracelular de IFN después de la estimulación nocturna con los antígenos equivalentes. Los resultados de un donante representativo se muestran en el Panel D. El Panel E muestra que las líneas son polifuncionales según se evalúa usando ICS para IFN y TNF en un donante representativo.

FIG. 6: Los CTL específicos de multiviral pueden expandirse *in vitro*. El día 9 después de la estimulación inicial, los CTL se reestimularon usando blastos PHA pulsados con mezcla pep. El panel A muestra la expansión de los CTL desde el inicio (día 0) hasta el día 16, después de una segunda estimulación el día 9/10 ( $n = 4$ ). La expansión de CTL se evaluó usando exclusión de azul de tripano y los resultados se muestran como números de células promedio +/- DT. El panel B muestra los resultados de 1 donante representativo que ilustra la especificidad antigénica de los CTL CD3/CD8+ y CD3/CD8- (CD4+) después de la segunda ronda de estimulación usando IFN ICS. El panel C muestra los resultados resumidos de 6 donantes después de la primera (día 9) y la segunda (día 16) estimulación, utilizando IFN ELIspot como lectura. Los resultados se expresan como células de entrada SFC/ $1 \times 10^5$  +/- DT y el control fue la liberación de IFN en respuesta a la estimulación con mezcla pep irrelevante. Las capacidades citotóxicas de los CTL generados se evaluaron mediante un ensayo de liberación de  $Cr^{51}$  estándar de 4-6 h utilizando blastos PHA pulsados con mezcla pep como dianas. La lisis específica después de la primera y segunda estimulación de 2 donantes representativos se muestra en el Panel D.

FIG. 7: Fenotipo y especificidad de los CTL específicos de Penton y LMP2 generados en presencia de diferentes citocinas promotoras del crecimiento. Análisis fenotípicos de CTL en el día 9 después del inicio con mezclas pep de Penton (arriba a la izquierda) o LMP2 (panel superior a la derecha) y cultivo en presencia o ausencia de diferentes citocinas. Los resultados se presentan como % medio de células positivas +/- DT. IFL ELIspot probó la especificidad de CTL de 3 donantes. Los resultados se expresan como células de entrada SFC/ $1 \times 10^5$  +/- DT y el control fue la liberación de IFN en respuesta a la estimulación con una mezcla pep irrelevante.

FIG. 8: Expansión de linfocitos T CD3+ después de la adición de citocinas promotoras del crecimiento. Los números de linfocitos T totales se calcularon en función de los números de células totales evaluadas mediante recuento de células usando exclusión con azul de tripano y el porcentaje de linfocitos T CD3+ detectados en el día 9 después del inicio de CTL evaluado mediante análisis de citometría de flujo. Se muestran los resultados de 5 donantes (número medio de células +/- EEM).

FIG. 9: La avididad de TCR es comparable en las PBMC activadas por el plásmido Hexon CD y estimuladas con mezcla pep. La avididad de TCR de CTL específicos de Hexon estimulados con CD nucleofecionados con plásmido o PBMC estimuladas con mezcla pep se probó mediante dilución en serie de mezcla pep Hexon o TDL de péptido restringido HLA-A1 con IFN ELIspot como lectura. Los resultados se representan como % de SFC máximo.

FIG. 10: Expansión comparable de CTL estimulados con mezclas pep agrupadas versus mezclas pep individuales. La expansión celular de CTL generados a partir de 2 donantes se evaluó usando exclusión con azul de tripano 9 días después de la estimulación de PBMC. Los resultados se expresan como números medios de células +/- DT.

FIG. 11: Falta de alorreactividad en PBMC estimuladas con mezcla pep. El potencial alorreactivo de los CTL activados con mezcla pep estimulados, ya sea una vez ( $n = 4$ ) o dos veces ( $n = 2$ ) se probó mediante el ensayo de liberación de  $Cr^{51}$  frente a un intervalo de blastos PHA alogénicos no coincidentes con HLA como dianas.

## Descripción detallada de la invención

### I. Definiciones

De acuerdo con una antigua convención de derecho de patentes, las palabras "un" y "uno/una" cuando se usan en la presente memoria descriptiva junto con la palabra que comprende, incluidas las reivindicaciones, denotan "uno o más". Los aspectos descritos en el presente documento pueden consistir o consisten esencialmente en uno o más elementos, etapas del método y/o métodos de la invención. Se contempla que cualquier método o composición descritos en el presente documento pueden implementarse con respecto a cualquier otro método o composición

descritos en el presente documento.

La expresión "antígeno tumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia antigénica producida/expresada en células tumorales y que desencadena una respuesta inmunitaria en el hospedador.

La expresión "antígeno vírico", como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno que es de naturaleza proteica y está estrechamente asociado con la partícula vírica. En realizaciones específicas, un antígeno vírico es una proteína de recubrimiento.

## II. Realizaciones generales de la invención

En determinados aspectos descritos en el presente documento, la presente divulgación se refiere al desarrollo de CTL que se dirigen a uno o más antígenos de al menos un virus o al menos un antígeno tumoral, por ejemplo. En algunos casos, los CTL se dirigen a uno o más antígenos de dos o más virus o dos o más tumores.

La presente divulgación se refiere a métodos para generar líneas de CTL con especificidad contra múltiples antígenos tumorales o múltiples virus en al menos realizaciones generales. En los métodos de producción de CTL, el antígeno se presenta a las PBMC (por ejemplo) en forma de uno o más péptidos que abarcan parte o la totalidad del antígeno. Los péptidos antigénicos pueden proporcionarse a las PBMC en una biblioteca de mezclas de péptidos, que pueden denominarse mezclas pep, y pueden proporcionarse múltiples bibliotecas de mezclas pep a la misma colección de PBMC. En algunas realizaciones, la colección incluye antígenos inmunodominantes y subdominantes.

Algunos aspectos descritos en el presente documento se utilizan en individuos después de un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT). Las infecciones víricas graves y fatales siguen siendo comunes después de un HSCT. La transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para los antígenos EBV, CMV y adenovíricos puede tratar infecciones que son impermeables a terapias convencionales, pero la implementación más amplia y la extensión a virus adicionales están limitadas por la competencia entre los antígenos procedentes de virus y los procedimientos de fabricación que consumen mucho tiempo y son laboriosos. En el presente documento se describe un sistema que genera rápidamente una sola preparación de CTL policlonales (CD4+ y CD8+) que es consistentemente específica para 15 antígenos inmunodominantes y subdominantes procedentes de 7 virus (EBV, CMV, Adv, BK, HHV6, RSV y virus de la gripe) que comúnmente causan morbilidad y mortalidad después de un trasplante. Los CTL pueden producirse rápidamente (10 días) mediante una sola estimulación de PBMC donantes con una mezcla de péptidos que abarca los antígenos diana en presencia de las posibles citocinas prosupervivencia IL4 e IL7. Este enfoque reduce el impacto de la competencia antigénica con el consiguiente aumento del repertorio antigénico y la frecuencia de linfocitos T específicos de virus. Los aspectos descritos en el presente documento pueden introducirse fácilmente en la práctica clínica y son una alternativa rentable a los agentes profilácticos antivíricos comunes para receptores de HSCT alogénicos.

## III. Patógenos y antígenos patógenos

En algunos aspectos descritos en el presente documento, los CTL generados se proporcionan a un individuo que tiene o está en riesgo de tener una infección patógena, que incluye una infección vírica, bacteriana o fúngica. El individuo puede o no tener un sistema inmunitario deficiente. En algunos casos, el individuo tiene una infección vírica, bacteriana o fúngica después de un trasplante de órganos o células madre (incluido el trasplante de células madre hematopoyéticas), o tiene cáncer o ha sido sometido a un tratamiento contra el cáncer, por ejemplo. En algunos casos, el individuo tiene infección después de una deficiencia adquirida del sistema inmunitario.

La infección en el individuo puede ser de cualquier tipo, pero, en aspectos específicos, la infección es el resultado de uno o más virus. El virus patógeno puede ser de cualquier tipo, pero, en realizaciones específicas, es de una de las siguientes familias: Adenoviridae, Picornaviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae, Flaviviridae, Retroviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Papovaviridae, Polyomavirus, Rhabdoviridae o Togaviridae. En algunos aspectos, el virus produce antígenos inmunodominantes o subdominantes o produce ambos tipos. En casos específicos, el virus se selecciona del grupo que consiste en EBV, CMV, adenovirus, virus BK, HHV6, VRS, virus de la gripe, virus de la paragripe, bocavirus, coronavirus, LCMV, paperas, sarampión, metapneumovirus, parvovirus B, rotavirus, virus del Nilo occidental, virus de la gripe española y una combinación de los mismos.

En algunos aspectos, la infección es el resultado de una bacteria patógena, y la presente invención es aplicable a cualquier tipo de bacteria patógena. Las bacterias patógenas ejemplares incluyen al menos *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Rickettsia prowazekii*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Campylobacter*, y *Salmonella*.

En algunos aspectos, la infección es el resultado de un hongo patógeno, y la presente invención es aplicable a cualquier tipo de hongo patógeno. Los hongos patógenos ejemplares incluyen al menos *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis*, o *Stachybotrys*.

## IV. Antígenos tumorales

En aspectos en los que se emplean CTL específicos de multiTAA para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, se pueden dirigir a una variedad de TAA. Los antígenos tumorales son sustancias producidas en las células tumorales que desencadenan una respuesta inmunitaria en un hospedador.

5 Los antígenos tumorales ejemplares incluyen al menos lo siguiente: antígeno carcinoembrionario (CEA, de sus siglas en inglés) para cánceres de intestino; CA-125 para cáncer de ovario; MUC-1 o antígeno tumoral epitelial (ETA, de sus siglas en inglés) o CA15-3 para cáncer de mama; tirosinasa o antígeno asociado a melanoma (MAGE) para melanoma maligno; y productos anormales de ras, p53 para una variedad de tipos de tumores; alfafetoproteína para hepatoma, 10 cáncer de ovario o testicular; subunidad beta de hCG para hombres con cáncer testicular; antígeno prostático específico para cáncer de próstata; beta 2 microglobulina para mieloma múltiple y en algunos linfomas; CA19-9 para cáncer colorrectal, del conducto biliar y pancreático; cromogranina A para cáncer de pulmón y próstata; TA90 para melanoma, sarcomas de tejidos blandos y cáncer de mama, colon y pulmón. Se conocen ejemplos de antígenos tumorales en la materia, por ejemplo, en Cheever *et al.*, 2009, que se incorpora en el presente documento como 15 referencia en su totalidad.

Los ejemplos específicos de antígenos tumorales incluyen al menos CEA, MHC, CTLA-4, gp100, mesotelina, PD-L1, TRP1, CD40, EGFP, Her2, TCR alfa, trp2, TCR, MUC1, cdr2, ras, 4-1BB, CT26, GITR, OX40, TGF- $\alpha$ . WT1, MUC1, LMP2, E6 E7 de PVH, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE A3, p53 no mutante, NY-ESO-1, PSMA, GD2, Melan A/MART1, 20 Ras mutante, gp 100, p53 mutante, Proteinasa3 (PR1), bcr-abl, Tirosinasa, Survivina, PSA, hTERT, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, Receptor de andrógenos, Ciclina B1, Ácido polisialílico, MYCN, RhoC, TRP-2, GD3, Fucosil GM1, Mesotelina, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, Anhidrasa carbónica IX, PAX5, OY-TES1, proteína espermática 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumaina, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR- $\beta$ , MAD-CT-2 y antígeno relacionado con Fos 1, por ejemplo. 25

#### V. Generación de Bibliotecas de mezclas pep

En algunas realizaciones de la invención, se proporciona una biblioteca de péptidos a las PBMC en última instancia 30 para generar CTL. La biblioteca, en casos particulares, comprende una mezcla de péptidos ("mezclas pep") que abarcan parte o la totalidad del mismo antígeno. Las mezclas pep utilizadas en la invención pueden provenir de bibliotecas de péptidos disponibles comercialmente formadas por péptidos que tienen una longitud de 15 aminoácidos y que se superponen entre sí por 11 aminoácidos, en ciertos aspectos. En algunos casos, pueden generarse 35 sintéticamente. Los ejemplos incluyen los de JPT Technologies (Springfield, VA) o Miltenyi Biotec (Auburn, CA). En realizaciones particulares, los péptidos tienen al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 o más aminoácidos de longitud, por ejemplo, y en realizaciones específicas hay una superposición de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, o 34 aminoácidos de longitud, por ejemplo. La mezcla de diferentes péptidos puede incluir cualquier proporción de los diferentes péptidos, aunque en algunas realizaciones cada péptido particular 40 está presente en sustancialmente los mismos números en la mezcla que otro péptido particular.

#### VI. Terapia de combinación

En determinados aspectos descritos en el presente documento que se refieren a CTL generados contra antígenos 45 tumorales, los aspectos clínicos descritos en el presente documento se combinan con otros agentes eficaces en el tratamiento de la enfermedad hiperproliferativa, tales como los agentes antineoplásicos. Un agente "antineoplásico" es capaz de afectar negativamente el cáncer en un sujeto, por ejemplo, mediante la destrucción de células cancerosas, la inducción de apoptosis en células cancerosas, la reducción de la tasa de crecimiento de las células cancerosas, la reducción de la incidencia o el número de metástasis, la reducción del tamaño del tumor, la inhibición del crecimiento 50 tumoral, la reducción del suministro de sangre a un tumor o células cancerosas, la estimulación de una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas o un tumor, la prevención o la inhibición de la progresión del cáncer, o el aumento de la vida útil de un sujeto con cáncer. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad combinada eficaz para destruir o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar poner en contacto las células cancerosas con la construcción de expresión y el (los) agente(s) o factor(es) múltiple(s) al mismo tiempo. Esto puede lograrse poniendo en contacto la célula con una composición o formulación farmacológica 55 única que incluye ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en donde una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye el segundo agente(s).

60 La resistencia de las células tumorales a los agentes de quimioterapia y radioterapia representa un problema importante en oncología clínica. Un objetivo de la investigación actual sobre el cáncer es encontrar formas de mejorar la eficacia de la quimioterapia y la radioterapia mediante la combinación con la terapia génica. Por ejemplo, el gen del herpes simple-timidina quinasa (HS-tK, de sus siglas en inglés), cuando se administra a los tumores cerebrales mediante un sistema de vectores retrovíricos, induce con éxito la susceptibilidad al agente antivírico ganciclovir<sup>51</sup>. En 65 el contexto de la presente divulgación, se contempla que la terapia celular podría usarse de manera similar junto con intervención quimioterapéutica, radioterapéutica o inmunoterapéutica, además de otros agentes proapoptóticos o

reguladores del ciclo celular.

De manera alternativa, la terapia descrita en el presente documento puede preceder o seguir al otro tratamiento del agente en intervalos que varían de minutos a semanas. En los aspectos en los que el otro agente y la terapia descritos en el presente documento se aplican por separado al individuo, en general, se aseguraría de que no pase un período de tiempo significativo entre el momento de administración, de modo que el agente y la terapia aún sean capaces de ejercer un efecto combinado ventajoso en la célula. En dichos casos, se contempla que uno pueda poner en contacto a la célula con ambas modalidades dentro de aproximadamente 12-24 h entre sí y, más preferentemente, dentro de aproximadamente 6-12 h entre sí. Sin embargo, en algunas situaciones, puede ser conveniente extender el período de tiempo para el tratamiento de manera significativa, en los que transcurren varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

Se pueden emplear diversas combinaciones, la presente divulgación es "A" y el agente secundario, tal como radio o quimioterapia, es "B":

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

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

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

Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que varias terapias estándar, así como la intervención quirúrgica, se pueden aplicar en combinación con la terapia celular de la invención.

#### A. Quimioterapia

Las terapias contra el cáncer también incluyen una variedad de terapias combinadas con tratamientos químicos y radiológicos. Las quimioterapias combinadas incluyen, por ejemplo, abraxano, altretamina, docetaxel, herceptin, metotrexato, novantrona, zoladex, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógenos, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier variante análoga o procedente de lo anterior.

#### B. Radioterapia

Otros factores que causan daño en el ADN y se han utilizado ampliamente incluyen lo que comúnmente se conoce como rayos  $\gamma$ , rayos X y/o la administración directa de radioisótopos a las células tumorales. También se contemplan otras formas de factores que dañan el ADN, como las microondas y la radiación UV. Es muy probable que todos estos factores afecten a una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN, y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para rayos X van desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante períodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del isótopo, la fuerza y el tipo de radiación emitida y la absorción por las células neoplásicas.

Los términos "contraído" y "expuesto", cuando se aplican a una célula, se usan en el presente documento para describir el proceso mediante el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se administran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. Para lograr la eliminación o la estasis celular, ambos agentes se administran a una célula en una cantidad combinada eficaz para destruir la célula o evitar que se divida.

#### C. Inmunoterapia

Los productos inmunoterapéuticos, en general, se basan en el uso de células y moléculas efectoras inmunitarias para atacar y destruir las células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de la terapia o puede reclutar otras células para afectar realmente la destrucción celular. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionúclido, la cadena A de ricina, toxina colérica, toxina Pertussis, *etc.*) y servir simplemente como un agente de direccionamiento. De manera alternativa, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interactúa, directa o indirectamente, con una diana de células tumorales. Varias células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y células NK.

La inmunoterapia, por lo tanto, podría usarse como parte de una terapia combinada, junto con la terapia celular descrita en el presente documento. El enfoque general para la terapia combinada se analiza a continuación. En general, la célula tumoral debe tener algún marcador que pueda ser dirigido, es decir, no está presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para dirigir en el contexto



de la presente divulgación. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de la próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155.

#### 5 D. Genes

En otro aspecto más, el tratamiento secundario es una terapia génica en la que se administra un polinucleótido terapéutico antes, después o al mismo tiempo que los aspectos clínicos descritos en el presente documento. Una variedad de productos de expresión están abarcados dentro de la divulgación, incluyendo inductores de la proliferación celular, inhibidores de la proliferación celular o reguladores de la muerte celular programada.

#### 15 E. Cirugía

Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterán a algún tipo de cirugía, que incluye cirugía preventiva, diagnóstica o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento contra el cáncer que se puede usar junto con otras terapias, como el tratamiento de la presente divulgación, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

La cirugía curativa incluye la resección en la que todo o parte del tejido canceroso se extrae, extirpa y/o destruye físicamente. La resección tumoral se refiere a la extirpación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección del tumor, el tratamiento mediante cirugía incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía de control miscópico (cirugía de Mohs). Se contempla además que los aspectos descritos en el presente documento se pueden usar junto con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres o cantidades incidentales de tejido normal.

Tras la escisión de parte o la totalidad de las células cancerosas, tejidos o tumores, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede lograr mediante perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia antineoplásica adicional. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser de diferentes dosis también.

#### 30 F. Otros agentes

Se contempla que se pueden usar otros agentes en combinación con los aspectos descritos en el presente documento para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que afectan la regulación positiva de los receptores de la superficie celular y las uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular o agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores apoptóticos. Los agentes inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral; interferón alfa, beta y gamma; IL-2 y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocinas; o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES, y otras quimiocinas. Se contempla además que la regulación positiva de los receptores de la superficie celular o sus ligandos tales como el ligando Fas/Fas, DR4 o DR5/TRAIL potenciaría las capacidades de inducción apoptótica de los aspectos descritos en el presente documento mediante el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino sobre las células hiperproliferativas. Los aumentos en la señalización intercelular mediante el aumento del número de uniones GAP aumentarían los efectos antihiperproliferativos en la población de células hiperproliferativas vecinas. En otro aspecto, los agentes citostáticos o de diferenciación pueden usarse en combinación con los aspectos descritos en el presente documento para mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Los inhibidores de la adhesión celular se contemplan para mejorar la eficacia de los aspectos descritos en el presente documento. Ejemplos de inhibidores de la adhesión celular son los inhibidores de la cinasa de adhesión focal (FAK, de sus siglas en inglés) y la lovastatina. Se considera además que otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, como el anticuerpo c225, podrían usarse en combinación con los aspectos descritos en el presente documento para mejorar la eficacia del tratamiento.

La terapia hormonal también se puede usar junto con los aspectos descritos en el presente documento o en combinación con cualquier otra terapia contra el cáncer descrita anteriormente. El uso de hormonas puede emplearse en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer como el de mama, próstata, ovario o cáncer cervical para reducir el nivel o bloquear los efectos de ciertas hormonas como la testosterona o el estrógeno. Este tratamiento a menudo se usa en combinación con al menos otra terapia contra el cáncer como una opción de tratamiento o para reducir el riesgo de metástasis.

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

#### 65 VII. Kits

Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, una biblioteca de mezclas pep puede estar comprendida en un kit, cualquier tipo de células puede proporcionarse en el kit, y/o pueden proporcionarse en el kit reactivos para la manipulación de mezclas pep y/o células.

5 Los componentes se proporcionan en medios recipientes adecuados.

Los kits pueden comprender una composición alícuota adecuada de los aspectos descritos en el presente documento. Los componentes de los kits pueden envasarse en medios acuosos o en forma liofilizada. El medio recipiente de los kits generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro medio recipiente, en el que se puede colocar adecuadamente un componente, y preferentemente, alícuotas. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que los componentes adicionales se pueden colocar por separado. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits también incluirán normalmente un medio para contener los componentes en confinamiento cerrado para venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico inyectados o moldeados por soplado en los que se retienen los viales deseados.

10

15

Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también se pueda proporcionar en otro medio recipiente.

20

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente los aspectos descritos en el presente documento.

25

#### EJEMPLO 1

##### IL2, IL15 e IL4+7 PROMOCIONAN LA EXPANSIÓN DE LINFOCITOS T ACTIVADOS CON PEPTIDOS *IN VITRO*

30 Para aumentar el intervalo de antígenos víricos que podría ser reconocido por una sola línea de CTL y mitigar el impacto de la competencia antigénica para retener los linfocitos T de alta y baja frecuencia, los inventores estimularon PBMC en presencia de diferentes citocinas Th1, pro-proliferativas y prosupervivencia. Luego, los inventores compararon la frecuencia y el repertorio de las células que responden con las generadas mediante la activación convencional en ausencia de citocinas. En experimentos exploratorios, se simuló PBMC con una mezcla pep (biblioteca de péptidos de 15mers superpuestos) que abarca el antígeno inmunodominante CMV-pp65, luego se expandió sin citocinas, o con medios complementados con (i) IL15 (5ng/ml), (ii) IL2 (20U/ml), o (iii) IL4 (1666U/ml) + IL7 (10ng/ml). Después de 9-12 días, los inventores evaluaron la expansión celular, el fenotipo, la especificidad y la función.

35

40 Los cultivos complementados con IL15 o IL4+7 mostraron la mayor expansión general ( $5 \pm 0,6$  y  $3,7 \pm 0,5$  veces de aumento, respectivamente) durante 9 días ( $n = 5$ ). Los cultivos que fueron estimulados en ausencia de citocinas no se expandieron ( $0,6 \pm 0,04$ ), mientras que la condición de IL2 fue intermedia ( $2,7 \pm 0,1$ ) (Figura 1A). Para determinar si los números de células superiores fueron una consecuencia de la proliferación de linfocitos T mejorada, la supervivencia mejorada o la combinación, las células se marcaron con CFSE en el día 0 y luego se analizaron cada 2-3 días para medir la duplicación celular, mientras que las células vivas y apoptóticas/necróticas se distinguieron mediante tinción con anexina-PI (no mostrada). El análisis de citometría de flujo no demostró diferencia en el número de divisiones celulares desde el día 0-5. Sin embargo, desde el día 5 en adelante, las células cultivadas en citocinas continuaron dividiéndose, mientras que en su ausencia, la división celular se redujo y la viabilidad fue consistentemente menor (Figura 1B). Estos datos indican que la supervivencia mejorada de las células en proliferación hizo la contribución principal al aumento observado en el número de células en cultivos complementados con citoquinas.

45

50

#### EJEMPLO 2

##### IL4+7 APOYA LA EXPANSIÓN SELECTIVA DE LOS LINFOCITOS T POLICLONALES POLARIZADOS CON TH1

55 La actividad y persistencia óptima de linfocitos T *in vivo* requiere tanto linfocitos T auxiliares (CD4+) como citotóxicos (CD8+) <sup>23</sup>. Por lo tanto, los inventores utilizaron análisis fenotípicos para determinar que las células en los cultivos complementados con citoquinas reflejaban la expansión selectiva de los linfocitos T policlones. Los inventores encontraron la frecuencia más baja de linfocitos T CD3+ en cultivos complementados con IL2 o IL15 ( $72,8 \pm 2,1$  % y  $61,3 \pm 3,7$  %, respectivamente), que en su lugar contenía un número significativamente mayor de células NK CD56+ que otras condiciones ( $27,1 \pm 2,3$  % y  $37,7 \pm 3,7$  %, respectivamente) ( $n = 5$ ). Por el contrario, los cultivos IL4+7 estaban compuestos casi en su totalidad por linfocitos T CD3+ ( $92,6 \pm 0,4$  %), con linfocitos T CD8+ y significativamente más linfocitos T CD4+ ( $61 \pm 2,7$  %) que las otras condiciones complementadas con citocinas (IL2  $26 \pm 4$  %, IL15  $17,6 \pm 4,3$  %,  $p = 0,024$ ,  $p = 0,004$ , respectivamente) (FIG. 1C). Para confirmar que los linfocitos T CD8+ y CD4+ eran específicos de antígeno y producían citocinas efectoras, los inventores realizaron tinción intracelular de citocinas (ICS, de sus siglas en inglés) para IFN. La FIG. 1D muestra resultados representativos de 1

60

65

donante, mientras que la FIG. 1E muestra resultados resumidos para 3 donantes. Los datos confirman que los cultivos complementados con IL4+7 contenían linfocitos T productores de IFN específicos de antígeno en ambos compartimentos (CD4+ 39,3 %  $\pm$  16,4 %, CD8+ 22,2 %  $\pm$  2,2 %), a niveles sustancialmente más altos que en otras condiciones (sin citocina: CD4+ 2,3 %  $\pm$  3,9 %, CD8+ 0,8 %  $\pm$  0,5 %; IL15: CD4+ 1,7 %  $\pm$  1,4 %, CD8+ 13,9 %  $\pm$  2,8 % e IL2: CD4+ 2,2 %  $\pm$  3,1 %, CD8+ 12,6 %  $\pm$  2,6 %, n = 3). Se obtuvieron resultados similares usando mezclas pep de antígenos víricos subdominantes Adv (Penton) y EBV (LMP2); de hecho, el crecimiento de células NK fue aún más evidente en las condiciones complementadas con IL2 e IL15 (FIG. 7).

IL4 es una citocina Th2 prototípica, por lo tanto, para evaluar de manera más exhaustiva el perfil de citocinas de los CTL inducidos, se evaluó el sobrenadante de los linfocitos T activados con antígeno usando la matriz luminex. La Figura IF muestra que, además de IFN $\gamma$ , las líneas complementadas con IL4+7 produjeron las citocinas Th1 prototípicas GM-CSF, IL-2 y TNF $\alpha$ , a niveles similares a los de los CTL inducidos por IL2. Además, los niveles de citocinas Th2 (IL5 e IL13) no fueron sustancialmente diferentes y no hubo evidencia de crecimiento regulatorio de linfocitos T, según se evaluó mediante tinción de CD4/CD25/FoxP3+ (FIG. 1G). Por lo tanto, IL4, en combinación con IL7, induce la expansión selectiva de linfocitos T policlonales polarizados con Th1 que producen múltiples citocinas efectoras tras la estimulación (FIG. 8).

### EJEMPLO 3

#### **LAS BIBLIOTECAS DE PEPTIDOS CON SUPERPOSICIÓN DE 15MER ACTIVAN LOS LINFOCITOS T CON ESPECIFICIDAD Y AVIDEZ SIMILARES A LAS GENERADAS CON ANTIGENO DE LONGITUD COMPLETA PROCESADO ENDÓGENAMENTE.**

Para abordar las preocupaciones de que las mezclas pep podrían reactivar los linfocitos T de baja avidez incapaces de reconocer los antígenos que las células infectadas por el virus procesan y presentan de forma natural, los inventores compararon los CTL activados por mezcla pep pp65 con los generados usando CD nucleofecionadas con un plásmido de ADN que codifica el mismo antígeno<sup>20,21</sup>. Después de la activación, cada conjunto de células se expandió en IL4+7. La expansión fue similar entre los grupos, con  $107 \pm 23,4 \times 10^6$  células generadas usando PB-MC pulsadas con mezcla pep (expansión de 7,2 veces) frente a  $130,3 \pm 46,9 \times 10^6$  células en los cultivos estimulados con CD (expansión de 8,7 veces) (FIG. 2A) (n = 3). El análisis fenotípico demostró que los CTL activados con mezcla pep eran predominantemente CD4+ (74,3  $\pm$  19,3 %), con un componente CD8+ menor (22,8  $\pm$  19,2 %), al igual que los CTL activados con plásmidos (CD4+ 70,6  $\pm$  14,2 % y CD8+ 26,5  $\pm$  13,4 %) y ambos expresaron niveles similares de memoria y marcadores de activación CD62L, CD28 y CD45RO (61  $\pm$  46,7 %, 86,5  $\pm$  3,5 %, 92  $\pm$  7,1 % mezcla pep frente a 77  $\pm$  28,3 %, 85,5  $\pm$  0,7 %, 87,5  $\pm$  13,4 % de plásmido) (FIG. 2B). A continuación, los inventores compararon la amplitud de los epítomos reconocidos mediante la medición de las respuestas a 110 péptidos de 20mer (superpuestos por 15aa) que abarcan CMV-pp65 y dispuestos en 22 grupos de manera que cada péptido se representara en 2 grupos<sup>24</sup>. La FIG. 2C muestra que tanto el reconocimiento de un péptido dado como la magnitud de la respuesta al mismo cambiaron poco por la fuente de antígeno. Finalmente, los inventores compararon la avidez funcional mediante IFN $\gamma$  ELISpot usando diluciones logarítmicas de los péptidos de mezcla pep pp65 o epítomo (A2-NLV y A24-QAD) como estímulo. Como se muestra en la FIG. 2D, no hubo diferencias significativas en la avidez de los CTL. Estos datos se confirmaron para otros antígenos víricos usando mezcla pep Adv-Hexon y el plásmido que codifica el antígeno vírico como estímulo (FIG. 9).

### EJEMPLO 4

#### **LOS PÉPTIDOS 15MER ACTIVAN LOS LINFOCITOS T CD4+ Y CD8+ EFICAZMENTE COMO PÉPTIDOS LARGOS (20MER O 30MER)**

Como los epítomos de CD4+ (> 20aa) pueden ser más largos que los epítomos de CD8 (8-10aa), los inventores determinaron a continuación si los péptidos más largos inducirían frecuencias más altas de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno. Los inventores obtuvieron tres bibliotecas de péptidos superpuestos (n.º 1 - 15mers superpuestos por 11, n.º 2 - 20mers superpuestos por 15, y n.º 3 - 30mers superpuestos por 15) que abarcan el extremo C (aa539-953) de Adv-Hexon; una región rica en epítomos CD4+ y CD8+<sup>25,26</sup> (FIG. 3A). Los inventores estimularon directamente las PBMC con cada una de las bibliotecas y evaluaron el fenotipo, la especificidad del epítomo y la amplitud de las líneas.

Fenotípicamente, las líneas fueron comparables, con un predominio de células CD4+ (media 56  $\pm$  5,5 % frente a 59  $\pm$  5,8 % frente a 60  $\pm$  6 %) y un componente menor CD8+ (media 21  $\pm$  0,2 % frente a 20  $\pm$  0,1 % frente a 16  $\pm$  0,2 %), y niveles similares marcadores de memoria y de activación CD62L, CD28 y CD45RO (CD62L - 60  $\pm$  1,9 % frente a 57  $\pm$  1,9 % frente a 51  $\pm$  1,6 %, CD28 - 88  $\pm$  0,6 % frente a 84  $\pm$  2,1 %, frente a 89  $\pm$  0,6 % y CD45RO - 58  $\pm$  1,7 % frente a 60  $\pm$  1,6 % frente a 60  $\pm$  1,2 %) (15mer frente a 20mer frente a 30mer) (n = 6). Para saber si el espectro de los epítomos reconocidos difiere en función de la biblioteca estimulante; los inventores volvieron a exponer los CTL inducidos con subgrupos de péptidos de cada biblioteca y no encontraron diferencias consistentes o estadísticamente significativas en la amplitud de péptidos reconocidos. Los resultados de los minigrupos que se vuelven a exponer de 15mer se muestran en la FIG. 3C. Dado que las mezclas pep de 15mer están fácilmente disponibles como productos de investigación y clínicos, los inventores realizaron todos los experimentos posteriores con esta fuente de antígeno.

**EJEMPLO 5****GENERACIÓN DE UN CULTIVO DE LINFOCITOS T ÚNICO CON ESPECIFICIDAD SIMULTÁNEA PARA ADV, EBV Y CMV**

Después de generar con éxito CTL utilizando péptidos procedentes de un único antígeno vírico y cultivar en IL4+7, los inventores prepararon un cultivo único de CTL que reconoce simultáneamente CMV, EBV y Adv. Para cada virus, los inventores se dirigieron a antígenos inmunogénicos; CMV - IE1 y pp65, Adv - Hexon y Penton, y EBV - EBNA1, LMP2 y BZLF1<sup>8,9,17,18,27-31</sup> y PBMC pulsadas con las mezclas pep relevantes antes del cultivo en IL4+7. Después de 9-12 días, los inventores compararon la reactividad antivírica de los CTL resultantes con los generados usando el protocolo de CTL de trivirus clínico actual que usa CD nucleofecionadas con plásmidos que codifican los mismos antígenos como estímulo<sup>20,21</sup> (FIG. 4). IFN $\gamma$  ELISpot confirmó que los CTL generados mediante mezclas pep de 4 donantes tenían actividad antivírica contra los tres virus y los siete antígenos estimulantes. La frecuencia de linfocitos T reactivos contra EBV (EBNA1, LMP2, BZLF1) y CMV (IE1, pp65) fue comparable independientemente del estímulo. Por el contrario, los 4 donantes tenían significativamente más linfocitos T reactivos a Adv (Hexon y Penton) en cultivos estimulados con mezclas pep [Hexon - media 462,3, intervalo 373-572,5 frente a media 112, intervalo 53-421,5 SFC/2x10<sup>5</sup> CTL; p = 0,01, Penton - media 317, intervalo 105,5-345 frente a media 51,25, intervalo 4-134 SFC/2x10<sup>5</sup> CTL, p = 0,02, mezcla pep frente a plásmido, respectivamente].

**EJEMPLO 6****EXTENSIÓN A VIRUS ADICIONALES**

Para determinar si el enfoque de estimulación directa de mezclas pep podría extenderse para generar líneas de CTL específicos de antivirus dirigidas a un espectro más amplio de diferentes virus clínicamente relevantes, los inventores estimularon PBMC con mezclas pep que abarcan 2 o 3 antígenos inmunogénicos de linfocitos T del CMV, Adv, EBV, BK, virus de la gripe, RSV y HHV6 (Tabla 1).

Tabla 1: Antígenos ejemplares de virus ejemplares

Virus	Antígeno
EBV	EBNA-1, LMP2, BZLF1
CMV	IE-1, pp65
Adenovirus	Hexon, Penton
virus BK	LT, VP-1
Gripe	MP1, NP1
RSV	N,F
HHV-6	U14, U90

Para determinar si la competencia antigénica impediría el agrupamiento, los inventores segregaron las mezclas pep y estimularon las PBMC con minigrupos que contienen mezclas pep de, A) cada virus; B) virus inmunodominantes (CMV, VRS, gripe, HHV6) y subdominantes (Adv, EBV, BK); C) virus líticos (Adv, RSV, gripe) y latentes (EBV, CMV, HHV6, BK), o D) una mezcla maestra de todas las mezclas pep (FIG. 5A). No hubo diferencia ni en la velocidad de expansión (FIG. 10), ni en la especificidad o magnitud global de la respuesta dirigida contra cada antígeno, independientemente de la composición del grupo estimulante de mezcla pep (FIG. 5B). Por lo tanto, todos los estudios posteriores utilizaron la mezcla maestra (condición D). La FIG. 5C muestra 8 líneas de CTL adicionales con especificidad de multivirus consistente. Las respuestas más altas se observaron contra CMV-pp65 y Adv-Hexon (951,6  $\pm$  82,1 y 461,4  $\pm$  19,2 SFC/1x10<sup>5</sup> CTL) mientras que la actividad contra HHV6-U90, EBV-BZLF1 y EBV-LMP2 fue más débil (26,9  $\pm$  4,2, 35,6  $\pm$  5, 39,6  $\pm$  2,6 SFC/1x10<sup>5</sup> CTL). Adv-Penton, virus de la gripe-MP1 y RSV-F demostraron tasas de respuesta intermedia (191  $\pm$  13,7, 117,6  $\pm$  8,6, 90,1  $\pm$  10,3 SFC/1x10<sup>5</sup> CTL, respectivamente) (FIG. 5C). Las líneas eran policlonales y polifuncionales con actividad contra los virus estimulantes detectables en las fracciones CD4+ y CD8+ (FIG. 5D), y las células reactivas producían una actividad *in vivo* superior tanto de IFN $\gamma$  como de TNF $\alpha$ <sup>32,33</sup>. La FIG. 5E muestra los resultados para un donante representativo en el que un 63 % de todos los Adv, 55 % de CMV, 40 % de EBV, 46 % de RSV, 36 % de virus de la gripe y 28 % de HHV6 para los que los CTL son específicos produjeron IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  después de la estimulación antigénica. El ICS para IFN $\gamma$  y/o TNF $\alpha$  mostró que un 67,7  $\pm$  13,3 % de todas las linfocitos T en cultivos multivirus eran específicos de antígeno. Es probable que este porcentaje se subestime ya que algunos CTL específicos de virus no producen citocinas ni producen citocinas efectoras distintas de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  33. Finalmente, a pesar de que estos CTL habían recibido solo una sola estimulación, no hubo evidencia de alorreactividad, evaluada mediante el ensayo de liberación de Cr<sup>51</sup> usando blastos de PHA no coincidentes con HLA como dianas (FIG. 10), una consideración importante si estas células se van a utilizar para el tratamiento de receptores

allogénicos de HSCT.

#### EJEMPLO 7

##### 5 EL CTL ESPECÍFICO DE MULTIVIRUS PUEDE EXPANDIRSE *IN VITRO*

Para descubrir si los CTL específicos de multivirus podrían expandirse aún más para proporcionar números adecuados para uso de terceros o "comercial", los inventores volvieron a estimular las células con blastos de PHA autólogas pulsadas con la misma mezcla maestra de mezclas pep. Se obtuvo una expansión secundaria de una media de  $8,4 \pm 2$  veces durante 7 días, hasta un número de células final de  $604,6 \pm 23,7 \times 10^6$  (FIG. 6A). La FIG. 6B muestra que los CTL expandidos permanecieron policlonales, con actividad detectada en los compartimientos de CD4+ y CD8+. La expansión se asoció con un aumento general en la magnitud de la respuesta dirigida contra todos los antígenos estimulantes en el día 16 en relación con el día 9 (FIG. 6C) de modo que  $> 80\%$  de las células en los cultivos reestimulados produjeron IFN $\gamma$  y/o TNF $\alpha$ . De manera similar, estos cultivos expandidos tenían una mayor actividad citolítica, que oscilaba entre  $> 60\%$  (CMV) al  $14\%$  (BK), lo que demuestra la especificidad retenida para los antígenos/virus subdominantes e inmunodominantes sin alorreactividad (FIG. 11).

#### EJEMPLO 8

##### 20 IMPORTANCIA DE DETERMINADOS ASPECTOS DESCRITOS EN EL PRESENTE DOCUMENTO

Los inventores han demostrado que pueden generar rápidamente linfocitos T policlonales, CD4+ y CD8+, con especificidades dirigidas a una amplia gama de virus líticos y latentes responsables de la infección en el hospedador inmunocomprometido y después de un HSCT. Estas células estaban polarizadas con Th1, tenían una gran avidez por una multiplicidad de antígenos víricos individuales, producían múltiples citocinas efectoras tras la estimulación y destruían dianas infectadas con virus sin alorreactividad. Debido a que los inventores generaron estos linfocitos T utilizando combinaciones de bibliotecas de péptidos clínicamente disponibles y citocinas pro-supervivencia, el enfoque debería ser adecuado para la aplicación clínica.

Si bien el CMV, el EBV y el Adv son las infecciones víricas detectadas con mayor frecuencia después de un HSCT allogénico, los receptores también son susceptibles a numerosos otros virus, incluidos BK, JC, HHV6, HHV7, virus de la gripe, virus de la paragripe, coronavirus y RSV, todos los cuales pueden causar morbilidad y mortalidad severas <sup>1,2</sup>. Varios de estos virus solo se detectan estacionalmente (por ejemplo, el virus de la gripe, VSR), mientras que otros, tales como HHV7, JC y coronavirus, son poco frecuentes, por lo que no es factible cubrir todos estos patógenos después de un trasplante mediante la generación de productos individualizados de linfocitos T específicos para virus y pacientes. Por lo tanto, los inventores buscaron desarrollar una estrategia que permitiera la producción de una sola línea de CTL con especificidad simultánea para una multiplicidad de antígenos.

En los ensayos clínicos actuales de linfocitos T específicos de virus, los inventores han utilizado EBV-LCL, adenovectores y/o plásmidos de ADN que codifican el antígeno vírico para generar linfocitos T dirigidos a virus <sup>7-9,20,21</sup>. El uso de un antígeno de longitud completa asegura que se puedan generar CTL de todos los donantes, independientemente de HLA, y que el antígeno es procesado fisiológicamente por APC y produce CTL que reconocen múltiples epítomos de linfocitos T CD4+ y CD8+ y tienen suficiente avidez para destruir dianas infectadas por un virus. La inducción de líneas que reconocen múltiples epítomos también minimiza el escape del virus debido a la pérdida de epítomos y produce una posible actividad antivírica y sostenida *in vivo* <sup>34</sup>. Sin embargo, los requisitos para virus/vectores vivos son barreras para estudios clínicos más amplios y de fase tardía, y también limitan el número de patógenos a los que se puede dirigir una sola línea de linfocitos T <sup>8,9</sup>. Por lo tanto, los inventores evaluaron si las mezclas pep clínicamente aplicables podrían usarse como alternativa. Aunque los estudios clínicos que utilizan péptidos de epítomos mínimos como vacunas han dado como resultado tolerancia inmunitaria o la activación de linfocitos T de baja avidez <sup>35</sup>, Melief y sus colegas demostraron recientemente mejores resultados con péptidos largos (22-45aa) que contienen secuencias de epítomo de CD4+ y CD8+ <sup>36</sup>. Observaron que estos péptidos largos fueron procesados endógenamente, presentados a los linfocitos T por APC e indujeron tanto linfocitos T auxiliares como citotóxicos, lo que dio como resultado respuestas de CTL robustas y eficaces <sup>36</sup>. Según estos datos, los inventores optaron por utilizar una fuente de antígeno completa en forma de bibliotecas de péptidos superpuestos, pero para la inducción óptima de CTL policlonales, los inventores compararon péptidos de diferentes longitudes (15mers, 20mers y 30mers) para la estimulación. Sin embargo, los inventores no vieron diferencias en el fenotipo, la especificidad o la amplitud del epítomo de las líneas, destacando las diferencias entre la administración de péptidos como una vacuna, donde uno se basa en APC endógenas para absorber y procesar la activación de los linfocitos T *in vitro* frente a antígeno usando APC profesionales dentro de las PBMC en relaciones óptimas de efector:diana <sup>37</sup>. Dada la disponibilidad clínica inmediata de mezclas pep que contienen péptidos 15mer que cubren todos los epítomos CD8+ posibles y la mayoría de los epítomos CD4+, los inventores sustituyeron esta fuente de antígeno y pudieron demostrar la equivalencia a los CTL "generados convencionalmente" con respecto a la especificidad y avidez del epítomo <sup>20,21</sup>.

Luego, los inventores abordaron la mejor manera de extender la amplitud de las especificidades de antígeno/epítomo que podrían acomodarse dentro de una sola línea de CTL. Fisiológicamente, los linfocitos T se activan cuando reciben señales de estimulación con TCR (señal 1), coestimulación (señal 2) y citocinas (señal 3). Los "CTL convencionales"

se activan en ausencia de citocinas exógenas, un déficit que parece afectar negativamente su capacidad proliferativa *in vitro* y también aumenta su susceptibilidad a la muerte celular inducida por activación (AICD, de sus siglas en inglés), lo que probablemente de como resultado un repertorio más restringido de reconocimiento de epítomos. De acuerdo con esta posibilidad, tanto la frecuencia como la amplitud de las células con especificidad vírica podrían aumentarse complementando los cultivos con citocinas inflamatorias y pro-supervivencia al inicio. Los inventores optaron por probar las citocinas que apoyan la proliferación celular *in vitro* e *in vivo* (IL2, IL15)<sup>38,39</sup>, así como combinaciones (IL4+7) que también apoyan la retención de un fenotipo de memoria central y promueven la supervivencia de linfocitos T mediante regulación positiva de moléculas antiapoptóticas, por ejemplo, Bcl-2<sup>40-43</sup>. Solo las líneas complementadas con IL4+7 promovieron selectivamente la expansión y supervivencia de los linfocitos T específicos de virus CD4+ y CD8+: cabe destacar que, las células inducidas se polarizaron con Th1 a pesar de la exposición a IL4, una citocina Th2 prototípica. Dada la disponibilidad clínica de ambas citocinas y su seguridad en ensayos clínicos en humanos<sup>44,45</sup>, IL4+7 cumplió con los requisitos del estudio actual, sin embargo, otras citocinas proinflamatorias capaces de imitar el entorno presente durante una infección vírica pueden producir beneficios similares. Por ejemplo, von Rossum y sus colegas informaron recientemente que los linfocitos T CD8+ activados con CD3/28 cultivados en un cóctel inflamatorio que consiste en IL1 + IL6 + IL23 sufrieron significativamente menos destrucción celular después de la activación en comparación con las células activadas en cualquiera de las citocinas solas o activadas en presencia de IL12<sup>46</sup>.

La estimulación directa de PBMC con mezclas pep y cultivo en condiciones complementadas con citocinas también permitió superar una segunda barrera importante para aumentar el espectro de virus dirigidos en una sola línea de CTL, a saber, la competencia antigénica resultante del uso de un APC común para presentar simultáneamente múltiples componentes antigénicos de diferentes virus<sup>8,9</sup>. La competencia antigénica resulta tanto del acceso limitado de los péptidos a las moléculas de HLA como de las limitaciones físicas en la estimulación simultánea de los linfocitos T de alta y baja frecuencia<sup>13,14</sup>. Para superar estos problemas, los investigadores han utilizado APC artificiales (AAPC, de sus siglas en inglés) que están genomanipuladas con moléculas para proporcionar el TCR y los eventos coestimuladores necesarios para la formación de la sinapsis inmunitaria<sup>47</sup>. Sin embargo, para evitar las inevitables complejidades y costes de introducir un producto celular modificado genéticamente en el proceso de fabricación, los inventores evaluaron si las PBMC de los pacientes podrían actuar como una fuente de células presentadoras y respondedoras de antígeno. Los linfocitos B, los monocitos y los macrófagos pueden tener la capacidad de presentar antígeno a los linfocitos T y estas APC pueden utilizar endo y exopeptidasas para liberar epítomos de clase I o clase II de péptidos 15mer<sup>48,49</sup>. Al aprovechar estas propiedades, los inventores pueden evitar la dependencia de una única APC que exprese de forma endógena múltiples antígenos a diferentes niveles como un estimulador de linfocitos T compartido y, en su lugar, tienen un grupo diverso de APC en el que cada célula tiene el potencial de mostrar un repertorio diverso de péptidos, lo que permite un acceso suficiente para los linfocitos T de alta y baja frecuencia. Por lo tanto, la competencia antigénica tanto dentro de la APC como entre los linfocitos T podría aliviarse. Como prueba de principio, los inventores generaron un solo cultivo de linfocitos T con reactividad para 15 antígenos procedentes de 7 virus latentes y líticos (EBV, CMV, BK, HHV6, Adv, gripe y RSV) utilizando mezclas pep agrupadas como estímulo y no se vio evidencia de competencia. Se pueden incluir patógenos adicionales en esta plataforma, aunque en algunos aspectos, en última instancia, los números de APC pueden llegar a ser limitantes; por lo tanto, las adiciones deben realizarse de manera gradual y se debe evaluar los cambios en la frecuencia y amplitud del reconocimiento de linfocitos T de todos los péptidos en la mezcla.

Críticamente para la viabilidad clínica, el enfoque fue capaz de producir grandes cantidades de linfocitos T específicos de virus. Mediante la siembra de solo  $1,5 \times 10^7$  PBMC en el G-Rex y una sola estimulación *in vitro*, los inventores podrían fabricar regularmente  $1 \times 10^8$  CTL en 10 días, con un enriquecimiento > 10 veces en células específicas de virus y una reducción correspondiente en los linfocitos T alorreactivos a los niveles observados en CTL convencionales estimulados repetidamente, que tienen un registro de seguridad comprobado *in vivo*<sup>7-9,50</sup>. Por lo tanto, utilizando la nueva tecnología de fabricación, los inventores predicen que los CTL específicos de multivirus serán seguros para la infusión después de una sola exposición a mezclas pep y proporcionarán protección antivírica de amplio espectro sin GvHD. En caso de que se requieran células adicionales, por ejemplo, si se establecen CTL específicos de virus almacenados para receptores de terceros, una segunda estimulación utilizando blastos de PHA pulsados con mezcla pep puede expandir el número total de CTL sin afectar su especificidad o amplitud de epítomo.

## EJEMPLO 9

### 55 MATERIALES Y MÉTODOS EJEMPLARES

#### A. Donantes y líneas celulares

Las PBMC se obtuvieron de voluntarios sanos con consentimiento informado utilizando un protocolo aprobado por el IRB del Baylor College of Medicine. Se utilizaron PBMC para generar CD, líneas CTL y blastos de PHA. Los blastos de PHA se generaron a partir de PBMC ( $2 \times 10^6$ /ml) usando PHA (5 µg/ml) y se mantuvieron en medios de CTL (RPMI 1640, Click's al 45 % (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), GlutaMAX TM-I 2 mM y suero AB humano al 5 %) complementado con IL2 (100 U/ml, NIH, Bethesda, VA), que se repone cada 3 días.

#### 65 B. Generación de CTL - Estimulación peptídica

**i. Péptidos/mezclas pep**

Para la estimulación de PBMC, los inventores usaron mezclas pep disponibles comercialmente (15mers superpuestos por 11aa que abarcan EBV-LMP2, BZLF1, EBNA1; Adv-Penton, Hexon; CMV-pp65, IE-1; BKV-VP1, T grande; virus de la gripe A-MP1 (H3N2), NP (H3N2); RSV-F, N, JPT Technology, Berlín, Alemania. Las mezclas pep que abarcan HHV6 U14 y U90 fueron sintetizadas por Genemed Synthesis Inc., San Antonio, Texas EE.UU.. Proimmune sintetizó bibliotecas de péptidos que abarcaban el extremo C de 414aa de Adv-Hexon, Oxford, Reino Unido o Alta Bioscience, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, Reino Unido. Los péptidos liofilizados se reconstituyeron a 5 mg/ml en DMSO.

**ii. Estimulación de PBMC**

Se sedimentaron  $15 \times 10^6$  PBMC frescas/congeladas en un tubo de 15 ml y se pulsaron durante 30-60 min a 37 °C con bibliotecas de péptidos/mezclas pep, individualmente o agrupadas, a una concentración de 100 ng/péptido/ $15 \times 10^6$  PBMC. Después de la incubación, las células se volvieron a suspender en medio CTL solo o se complementaron con citocinas (como se describe a continuación) y se transfirieron a un G-Rex10 (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN) ( $15 \times 10^6$ /G-Rex10) o se colocaron en una placa de 24 pocillos ( $2 \times 10^6$ /pocillo). Los medios y las citocinas se reabastecieron el día 5, y los cultivos se dividieron cuando alcanzaron una densidad  $> 50 \times 10^6$ /G-Rex10 o  $> 3 \times 10^6$  células/24 pocillos. En los días 9-12, los CTL se recogieron, contaron y usaron para estudios fenotípicos y funcionales.

**iii. Citocinas para promover la activación y expansión de CTL**

Los inventores compararon 4 condiciones; (i) sin citocina, (ii) IL7 (10 ng/ml) + IL4 (1666 U/ml), (iii) IL15 (5 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN) y (iv) IL2 (20 U/ml). Se añadieron citocinas a los CTL en el día 0 y se repusieron el día 5. En algunos aspectos, se emplean 400 U de IL4.

**iv. Expansión de CTL**

Para la expansión, los CTL se reestimularon en una relación S:R de 1:1 con blastos de PHA autólogos pulsados con mezcla pep irradiados (30 Gy) en medios de CTL con IL4+7 e IL15 (5 ng/ml) el día de la reestimulación y se alimentaron con IL15 dos veces por semana. Siete días después, se recogieron los CTL y se usaron para estudios adicionales.

**C. Citometría de flujo****i. Inmunofenotipado**

Los CTL se tiñeron en la superficie con anticuerpos monoclonales para: CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD28, CD45RO, y CD62L (Becton Dickinson BD, Franklin Lakes, NJ). Las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS, de sus siglas en inglés) (Sigma, St Louis, MO) que contenía FBS al 2 % (HyClone, Thermo Fisher Scientific Inc, NH), se sedimentaron y se añadieron anticuerpos en cantidades saturantes (10 ml). Después de 15 minutos a 4 °C en oscuridad, las células se lavaron dos veces y se analizaron. Se adquirieron aproximadamente 20.000 células vivas utilizando un FACSCalibur equipado con el programa informático Cell Quest

**ii. CFSE**

Para medir la proliferación celular se aislaron PBMC, se sedimentaron y se pulsaron con mezcla pep pp65 (100 ng/ $15 \times 10^6$  PBMC) durante 30-60 min. A continuación, las PBMC se lavaron dos veces usando PBS + FBS al 0,1 % y se incubaron durante 10 minutos con  $1501/20 \times 10^6$  PBMC, CFSE 10  $\mu$ M. Posteriormente, se añadió FBS en una relación 1:1 y se incubó durante 10 minutos a 37 °C. Después del marcado con CFSE, las PBMC se lavaron dos veces usando PBS + FBS al 2 % y se colocaron en placas a una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml en medio CTL con citocinas. La dilución de CFSE se examinó cada 2-3 días mediante flujo después de la tinción de la superficie con CD3, CD4, CD8 y CD56.

**iii. Tinción de FoxP3**

Para medir los linfocitos T reguladores, se realizó la tinción de Foxp3 usando el kit de tinción de FoxP3 de e-Bioscience. En resumen, los CTL se dejaron reposar en medios de CTL durante 48 h, luego se volvieron a suspender  $1 \times 10^6$  CTL en PBS + FBS al 2 % y se tiñeron en la superficie para CD3, CD25 y CD4. Después del lavado, las células se volvieron a suspender en 1 ml de solución de fijación/permeabilización y se incubaron durante 1 hora a 4 °C, luego se lavaron, se volvieron a suspender en tampón de permeabilización y se incubaron con 0,2  $\mu$ l de isotipo o 10  $\mu$ l de anticuerpo FoxP3 (clon PCH101) durante 30 minutos a 4 °C. Después de un lavado final, se adquirieron las células usando un FACSCalibur equipado con el programa informático Cell Quest.

**iv. Tinción intracelular de citocinas**

los CTL se recogieron, se resuspendieron a una concentración de  $5 \times 10^6$ /ml en medio CTL y se colocaron en placas a 200  $\mu$ l/pocillo en una placa de 96 pocillos. Luego se estimularon las células con 100 ng de mezcla pep de prueba o de control en presencia de Brefeldin A (1  $\mu$ g/ml), (BD) CD28 y CD49d (1  $\mu$ g/ml) durante 5-7 horas. Posteriormente, los CTL se lavaron con PBS + FBS al 2 %, se sedimentaron y se tiñeron en la superficie con CD8, CD4 y CD3 (10  $\mu$ l/anticuerpo/tubo). Después de 15 minutos, las células se lavaron dos veces, se sedimentaron, se fijaron y se permeabilizaron con solución Cytotfix/Cytoperm (BD) durante 20 minutos a 4 °C en oscuridad. Después de lavar dos veces con PBS/FBS al 2 % que contenía saponina al 0,1 % (Calbiochem, EMD Chemicals, NJ), las células se incubaron con 20  $\mu$ l de anticuerpos de IFN $\gamma$  y/o TNF $\alpha$  (BD) durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Luego se lavaron las células dos veces con PBS frío/FBS al 2 % que contenía saponina al 0,1 % y se analizaron al menos 200.000 células vivas de cada población con un FACSCalibur equipado con el programa informático Cell Quest (BD).

## D. Estudios funcionales

### i. Ensayo múltiple

Para evaluar la producción de citocinas, los inventores utilizaron ensayos múltiples. Se volvieron a estimular  $1 \times 10^5$  pp65-CTL usando 500 ng/ml de mezcla pep pp65 o de control. Después de 16 horas, se recogió el sobrenadante y se evaluó el perfil de citocinas utilizando el panel de perlas magnéticas de citocina humana de alta sensibilidad MILLIPLEX (Millipore, Billerica, MA). Específicamente, se incubaron 50  $\mu$ l de sobrenadante durante la noche a 4 °C con perlas de anticuerpo de citocina. Después de la incubación, las muestras se lavaron y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con el anticuerpo de detección biotinilado. Finalmente, se añadió estreptavidina-ficoeritrina durante 30 minutos a TA, luego las muestras se lavaron y analizaron usando el instrumento Luminex 200. Las muestras se analizaron por duplicado.

### ii. Ensayo de inmunopuntos ligado a enzimas

Los inventores utilizaron ELISpot para cuantificar los linfocitos T productores de IFN $\gamma$  y evaluar la amplitud de la reactividad en las líneas de CTL. Las poblaciones se diluyeron en serie de  $4 \times 10^5$  células/pocillo, y se midió la actividad específica de antígeno después de la estimulación directa de mezcla pep o minigrupos de péptidos. Cada condición se analizó por triplicado. Después de 20 horas, las placas se desarrollaron como se describió previamente <sup>22</sup> se secaron durante la noche a TA, luego se enviaron a Zellnet Consulting, Nueva York, NY, para su cuantificación. Se trazaron SFC y los números de célula de entrada, y se calculó una regresión lineal después de excluir los puntos de datos de meseta.

### iii. Evaluación de avidez de TCR

La avidez de TCR fue evaluada por IFN ELISpot. Se estimularon  $2 \times 10^5$  CTL con diluciones en serie de mezclas pep (pp65, Hexon) o péptidos 9mer (NLV-pp65: NLVPMVATV HLA-A2 restringido, QYD-pp65: QYD- PVAALF HLA-A24 restringido; TDL-Hexon: TDLGQNLLY HLA-A1 restringido). La frecuencia de linfocitos T específicos para cada antígeno/péptido se expresó como un porcentaje del número máximo de SFC/células de entrada.

### iv. Ensayo de liberación de cromo

Los inventores midieron la especificidad citotóxica en un ensayo de liberación de Cr<sup>51</sup> estándar de 4 horas, usando relaciones de E:D de 40:1, 20:1, 10:1 y 5:1. Los CTL se usaron como efectores y las dianas fueron blastos de PHA pulsados con mezclas pep. Los blastos de PHA autólogos y alogénicos solos o cargados con una mezcla pep irrelevante se usaron como controles de especificidad y alorreactividad. El porcentaje de lisis específica se calculó como [(liberación experimental - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea)] x 100.

## 50 PUBLICACIONES

1. Schonberger S, Meisel R, Adams O, et al. Prospective, comprehensive and effective viral monitoring in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2010.
- 55 2. Verdeguer A, de Heredia CD, Gonzalez M, et al. Observational prospective study of viral infections in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 3-year GETMON experience. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(1):119-124.
- 60 3. Lang P, Handgretinger R. Haploidentical SCT in children: an update and future perspectives. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42 Suppl 2:S54-S59.
4. Sauter C, Abboud M, Jia X, et al. Serious infection risk and immune recovery after double-unit cord blood transplantation without antithymocyte globulin. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2011; 17(10): 1460-1471.
- 65 5. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazon MC, et al. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J.Antimicrob.Chemother.* 2010;65(12):2628-2640.



6. Ljungman P, Ribaud P, Eyrich M, et al. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(6):481-486.
- 5 7. Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med.* 1994;331:679-680.
- 10 8. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat. Med.* 2006;12(10):1160-1166.
- 15 9. Leen AM, Christin A, Myers GD, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplant. *Blood.* 2009.
- 20 10. Barker JN, Doubrovina E, Sauter C, et al. Successful treatment of EBV-associated posttransplantation lymphoma after cord blood transplantation using third-party EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood.* 2010;116(23):5045-5049.
- 25 11. Haque T, Wilkie GM, Taylor C, et al. Treatment of Epstein-Barr-virus-positive posttransplantation lymphoproliferative disease with partly HLA- matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet.* 2002;360(9331):436-442.
- 30 12. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood.* 2007; 110(4): 1123-1131.
- 35 13. Kedl RM, Rees WA, Hildeman DA, et al. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp.Med.* 2000;192(8):1105-1113.
- 40 14. Kedl RM, Schaefer BC, Kappler JW, Marrack P. T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs *in vivo.* *Nat. Immunol.* 2002;3(1):27-32.
- 45 15. Leen A, Ratnayake M, Foster A, et al. Contact- activated monocytes: efficient antigen presenting cells for the stimulation of antigen-specific T cells. *J.Immunother.(1997.).* 2007;30(1):96-107.
- 50 16. Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J. Exp.Med.* 2005;202(3):379-386.
- 55 17. Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, et al. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology.* 2006;134(1):64-76.
- 60 18. Feuchtinger T, Opher K, Bethge WA, et al. Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood.* 2010;116(20):4360-4367.
- 65 19. Khanna N, Stuehler C, Conrad B, et al. Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood.* 2011;118(4):1121-1131.
20. Gerdemann U, Vera JF, Rooney CM, Leen AM. Generation of multivirus-specific T cells to prevent/treat viral infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *J.Vis.Exp.* 2011;(51).
21. Gerdemann U, Christin AC, Vera JF, et al. Nucleofection of DCs to Generate Multivirus-specific T Cells for Prevention or Treatment of Viral Infections in the Immunocompromised Host. *Molecular Therapy.* 2009.
22. Fujita Y, Leen AM, Sun J, et al. Exploiting cytokine secretion to rapidly produce multivirus-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J.Immunother.* 2008;31(7):665-674.
23. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N.Engl.J.Med.* 1995;333(16):1038-1044.
24. Kern F, Faulhaber N, Frommel C, et al. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol.* 2000;30(6):1676-1682.
25. Leen AM, Sili U, Savoldo B, et al. Fiber-modified adenoviruses generate subgroup cross-reactive, adenovirus-

- specific cytotoxic T lymphocytes for therapeutic applications. *Blood*. 2004; 103(3):1011-1019.
26. Leen AM, Christin A, Khalil M, et al. Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy. *Journal of Virology*. 2008;82(1):546-554.
- 5 27. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J. Exp.Med*. 2005;201(7):1031-1036.
- 10 28. Micklethwaite KP, Clancy L, Sandher U, et al. Prophylactic infusion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes stimulated with Ad5f35pp65 gene-modified dendritic cells after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112(10):3974-3981.
- 15 29. Bollard CM, Gottschalk S, Huls MH, et al. *In vivo* expansion of LMP1- and LMP2-specific T-cells in a patient who received donor-derived EBV-specific T- cells after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk.Lymphoma*. 2006;47(5):837-842.
- 20 30. Falco DA, Nepomuceno RR, Krams SM, et al. Identification of Epstein-Barr virus-specific CD8+ T lymphocytes in the circulation of pediatric transplant recipients. *Transplantation*. 2002;74(4):501-510.
- 25 31. Jones K, Nourse JP, Morrison L, et al. Expansion of EBNA1-specific effector T cells in posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood*. 2010;116(13):2245-2252.
- 30 32. Badr G, Bedard N, bdel-Hakeem MS, et al. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8+ memory T cells. *Journal of Virology*. 2008;82(20):10017-10031.
- 35 33. Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR. Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *Journal of Virology*. 2007;81(16):8468-8476.
- 40 34. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, et al. Longterm outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*. 2010;115(5):925-935.
- 45 35. Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief CJ, Kast WM. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc.Natl.Acad.Sci. EE.UU*. 1996;93(15):7855-7860.
- 50 36. Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, et al. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N.Engl.J.Med*. 2009;361(19):1838-1847.
- 55 37. Toes RE, van d, V, Schoenberger SP, et al. Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J. Immunol*. 1998; 160(9):4449-4456.
- 60 38. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J.Natl.Cancer Inst*. 1994;86(15):1159-1166.
- 65 39. Becker TC, Wherry EJ, Boone D, et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J. Exp.Med*. 2002;195(12):1541-1548.
40. Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P. Cytokine-induced survival of activated T cells *in vitro* and *in vivo*. *Proc.Natl.Acad.Sci. EE.UU*. 1998;95(7):3810-3815.
- 45 41. Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J. Exp.Med*. 2002;195(12):1523-1532.
- 50 42. Melchionda F, Fry TJ, Milliron MJ, McKirdy MA, Tagaya Y, Mackall CL. Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. *J.Clin.Invest*. 2005; 115(5):1177-1187.
- 55 43. Chetoui N, Boisvert M, Gendron S, Aoudjit F. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology*. 2010;130(3):418-426.
- 60 44. Sportes C, Babb RR, Krumlauf MC, et al. Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy. *Clin. Cancer Res*. 2010;16(2):727-735.
- 65 45. Majhail NS, Hussein M, Olencki TE, et al. Phase I trial of continuous infusion recombinant human interleukin-4 in patients with cancer. *Invest New Drugs*. 2004;22(4):421-426.

46. von RA, Krall R, Escalante NK, Choy JC. Inflammatory cytokines determine the susceptibility of human CD8 T cells to Fas-mediated activation-induced cell death through modulation of FasL and c-FLIP(S) expression. *J.Biol.Chem.* 2011;286(24) :21137-21144.
- 5 47. Maus MV, Thomas AK, Leonard DG, et al. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat.Biotechnol.* 2002;20(2):143-148.
- 10 48. Kessler JH, Khan S, Seifert U, et al. Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nat. Immunol.* 2011;12(1):45-53.
49. Larsen SL, Pedersen LO, Buus S, Stryhn A. T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *J. Exp.Med.* 1996; 184(1):183-189.
- 15 50. Melenhorst JJ, Leen AM, Bollard CM, et al. Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood.* 2010;116(22):4700-4702.
- 20 51. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM, *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors., *Science.* 12 de junio de 1992; 256(5063):1550-2.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para generar linfocitos T citotóxicos (CTL) que se dirigen a, al menos, un antígeno de dos o más virus, que comprende las etapas de:

- 5
- poner en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con al menos dos bibliotecas de péptidos, comprendiendo cada una de dichas bibliotecas de péptidos, péptidos que se superponen en secuencia para abarcar parte o la totalidad de un antígeno vírico y que tienen al menos siete aminoácidos de longitud; y
  - expandir la cantidad de linfocitos T específicos de virus en presencia de una o más citocinas,

10 en donde:

- 15
- (a) uno de los virus es el virus BK y el antígeno se selecciona de LT y VP-1; o
  - (b) uno de los virus es HHV6 y el antígeno se selecciona de U14, U11, U71, U54 y U90; o
  - (c) uno de los virus es RSV y el antígeno se selecciona de N y F; o
  - (d) uno de los virus es el virus de la gripe y el antígeno se selecciona de MP1 y NP1,

y en donde el método se realiza en ausencia de células dendríticas pulsadas por péptidos aisladas.

20 2. El método de la reivindicación 1, en donde la una o más citocinas se seleccionan del grupo que consiste en IL4, IL7 y una combinación de las mismas.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde los péptidos se superponen por al menos tres aminoácidos.

25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los CTL son CTL CD4+ y CD8+ policlonales.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de exponer los CTL a una o más composiciones que estimulan la división celular.

30

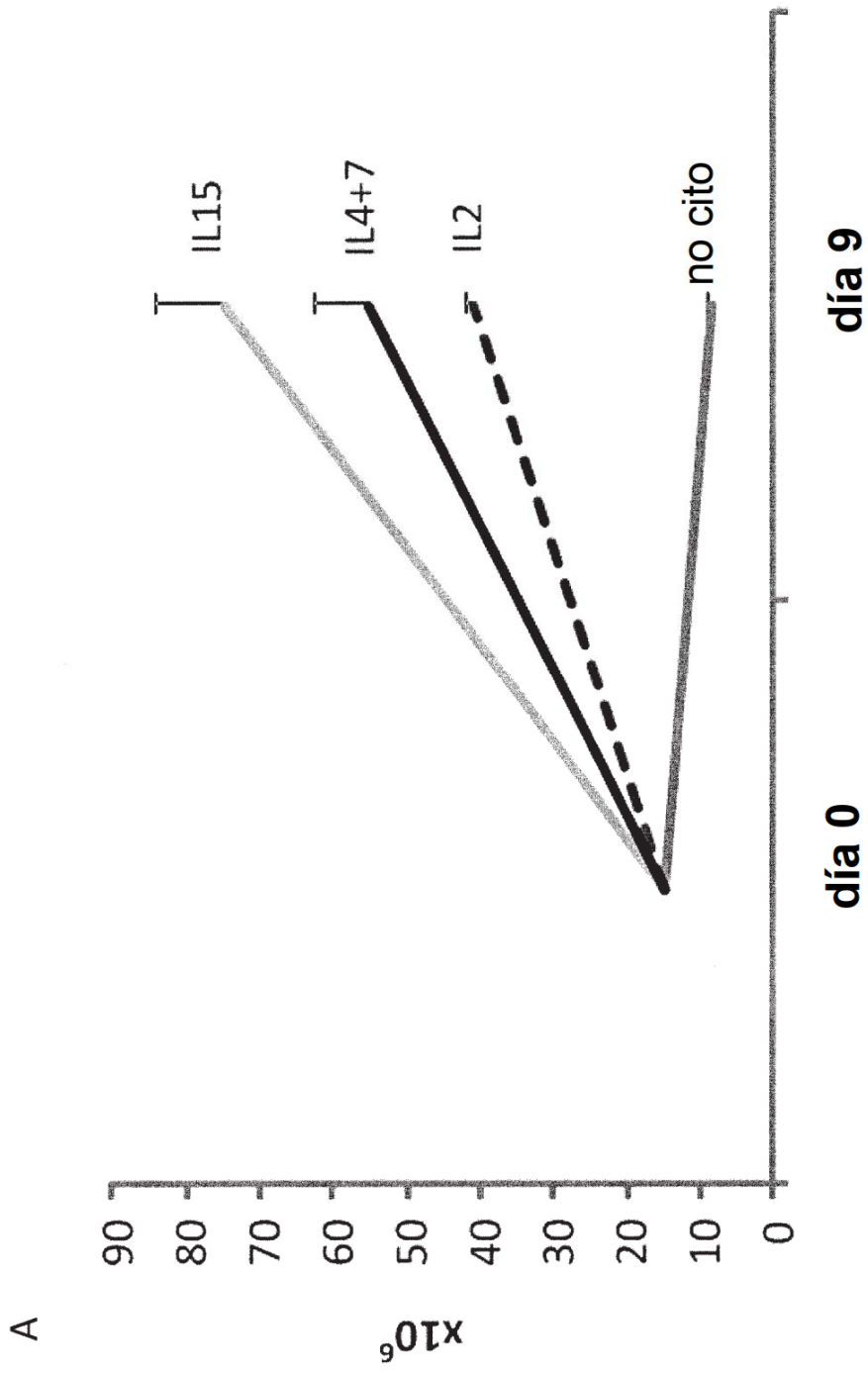


FIG. 1

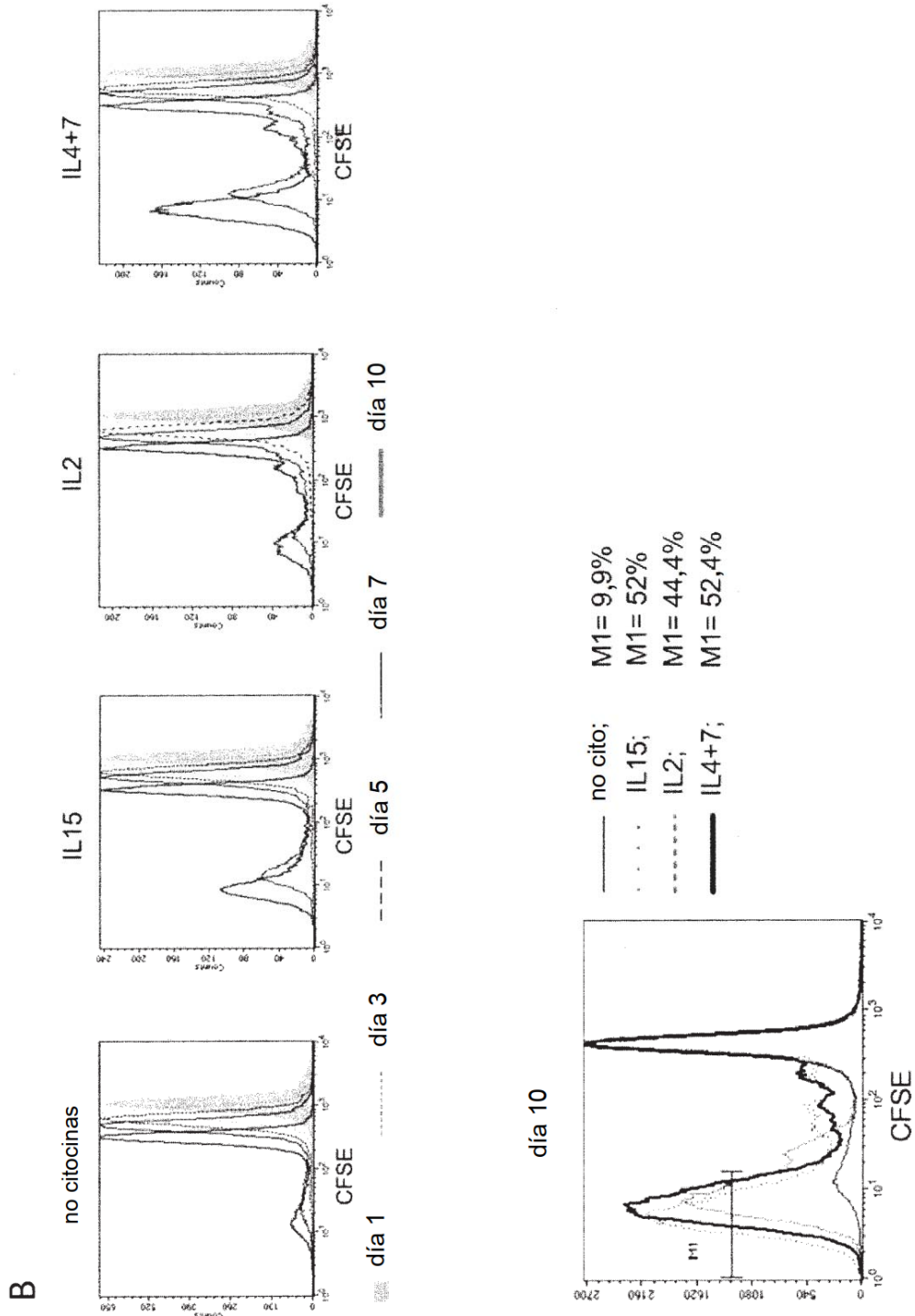


FIG. 1

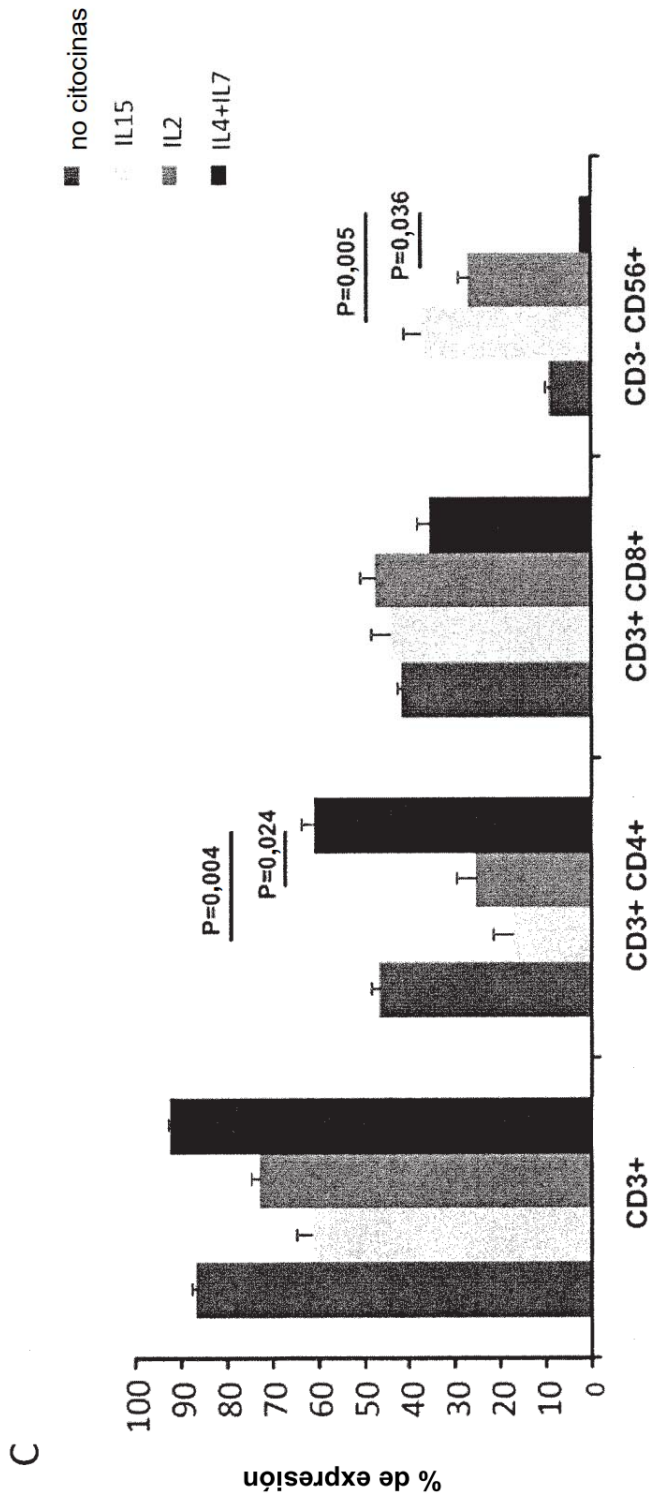


FIG. 1

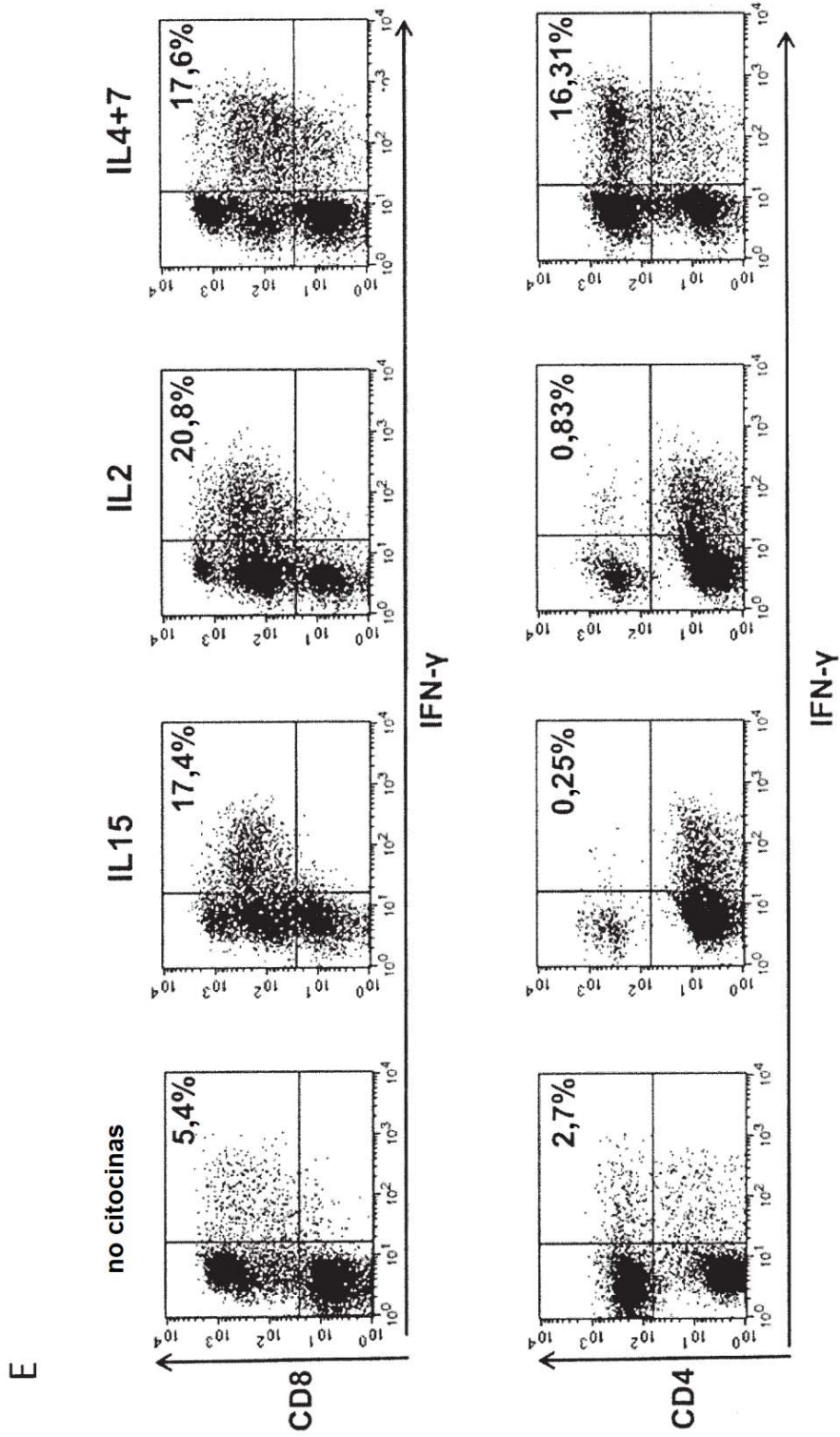


FIG. 1



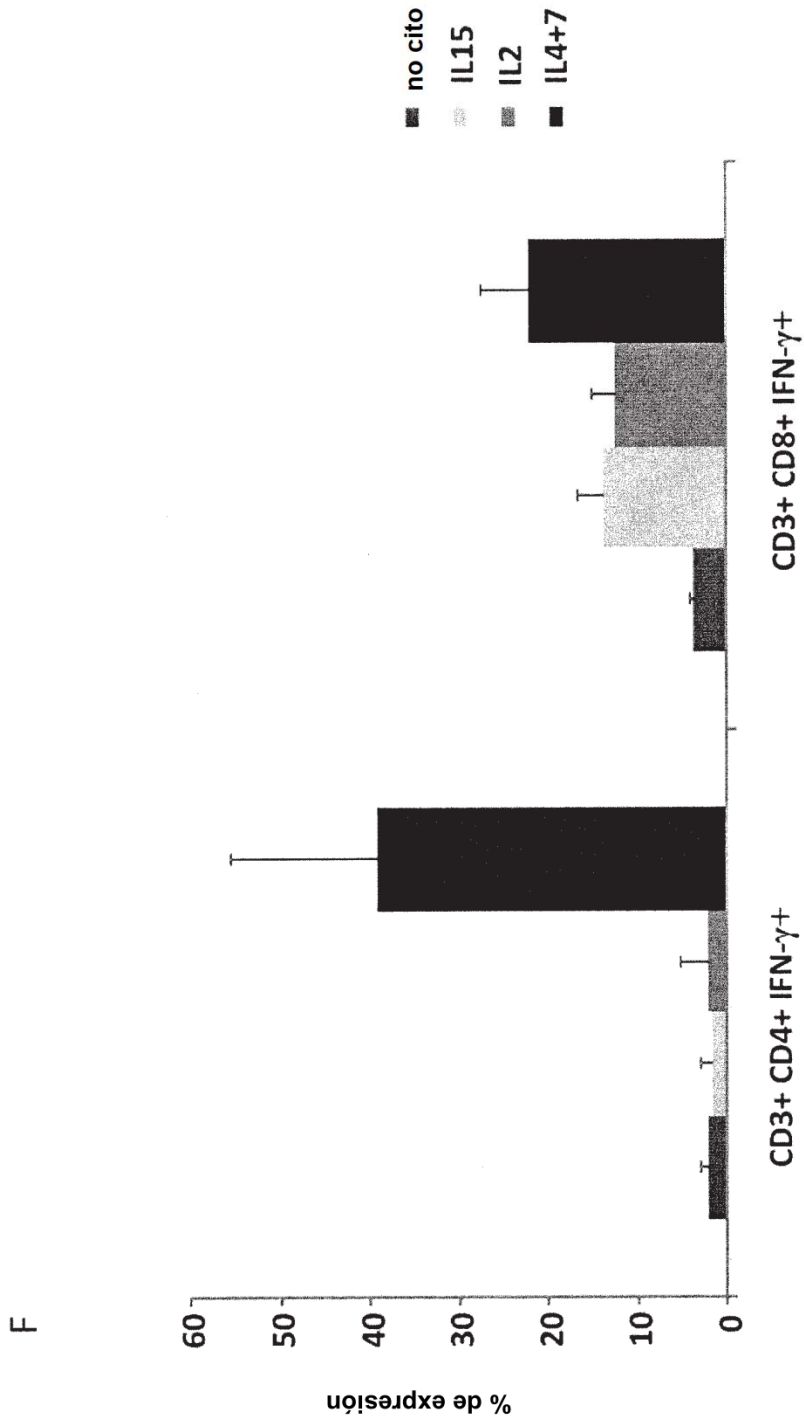


FIG. 1

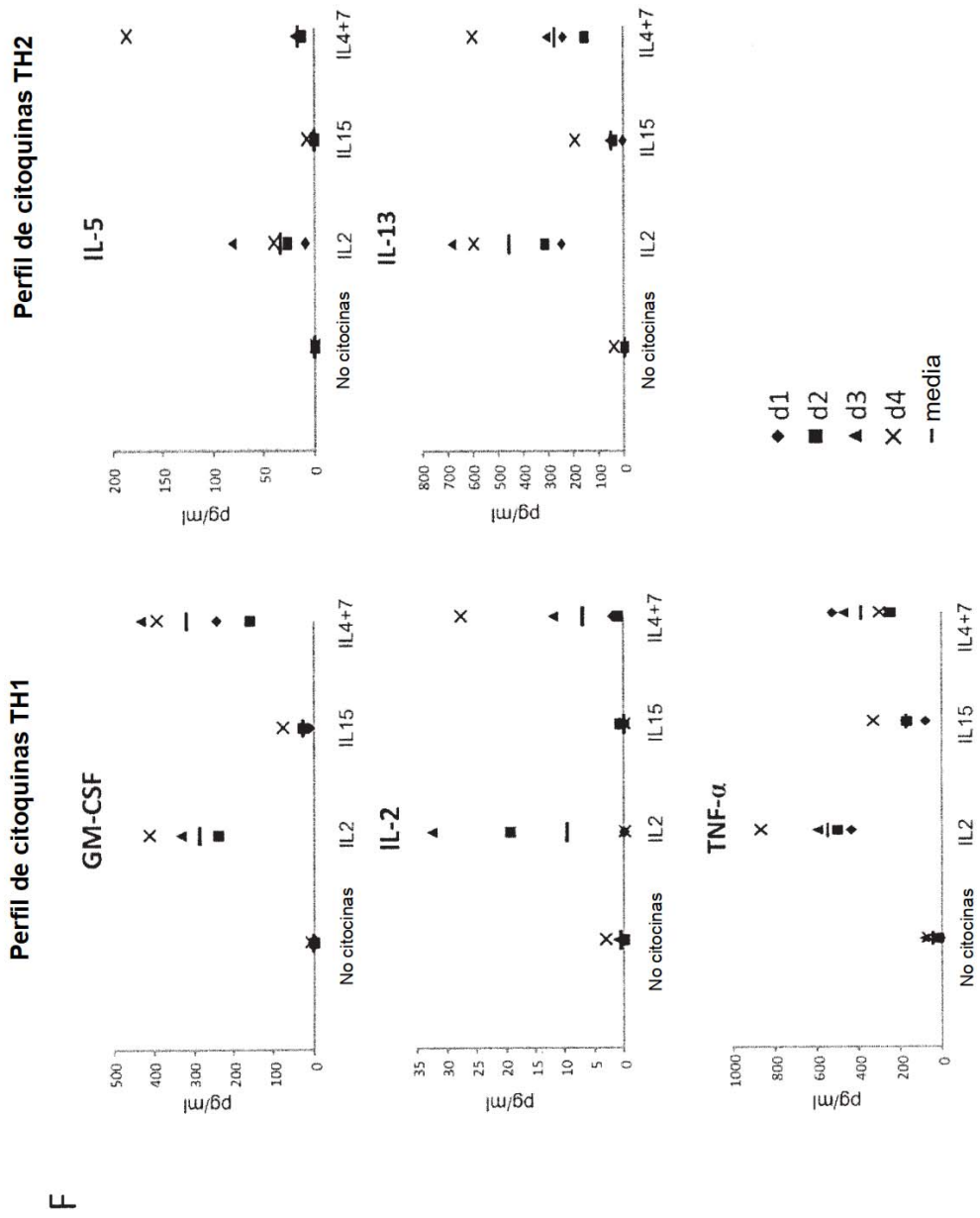


FIG. 1

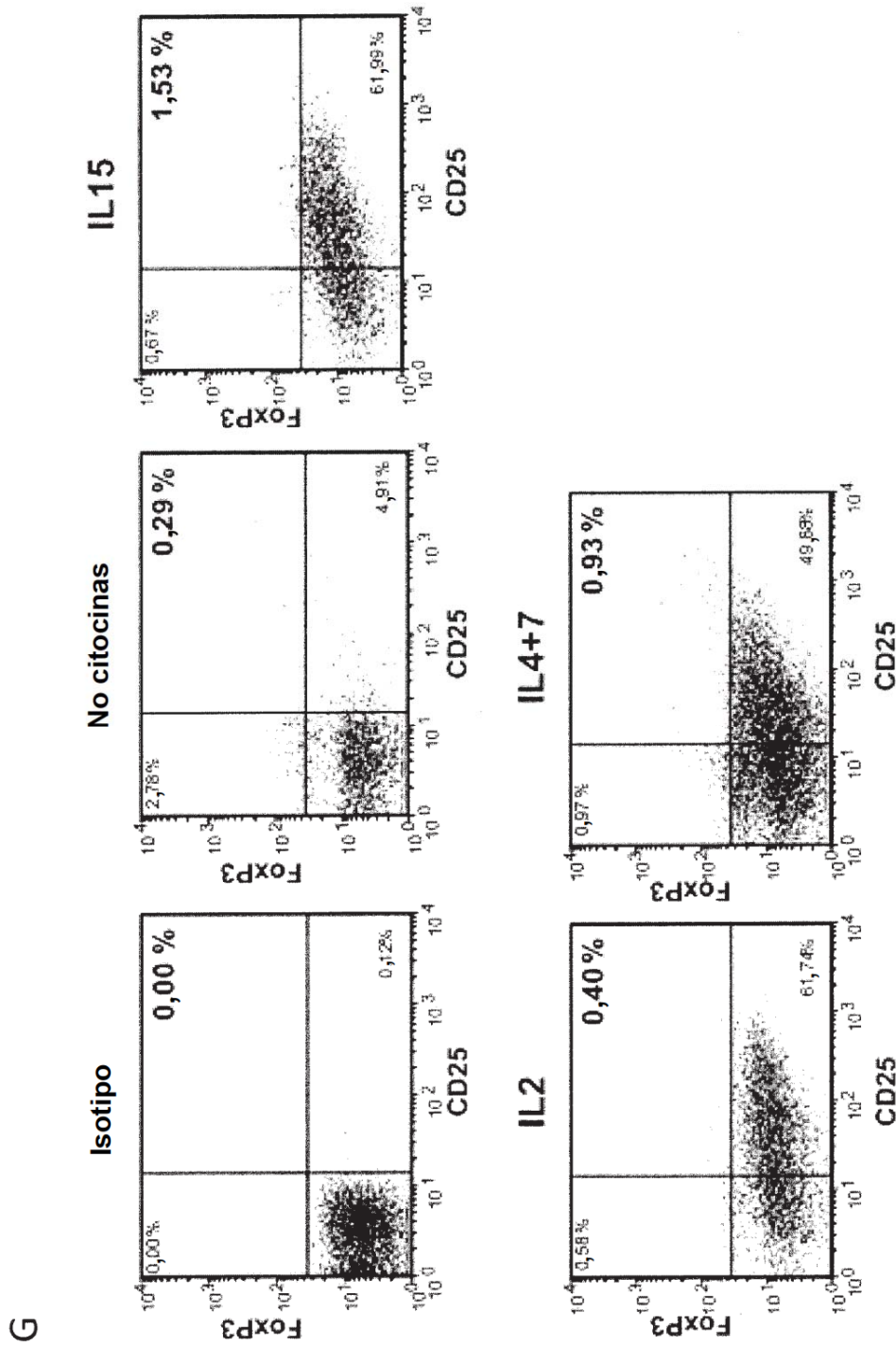


FIG. 1

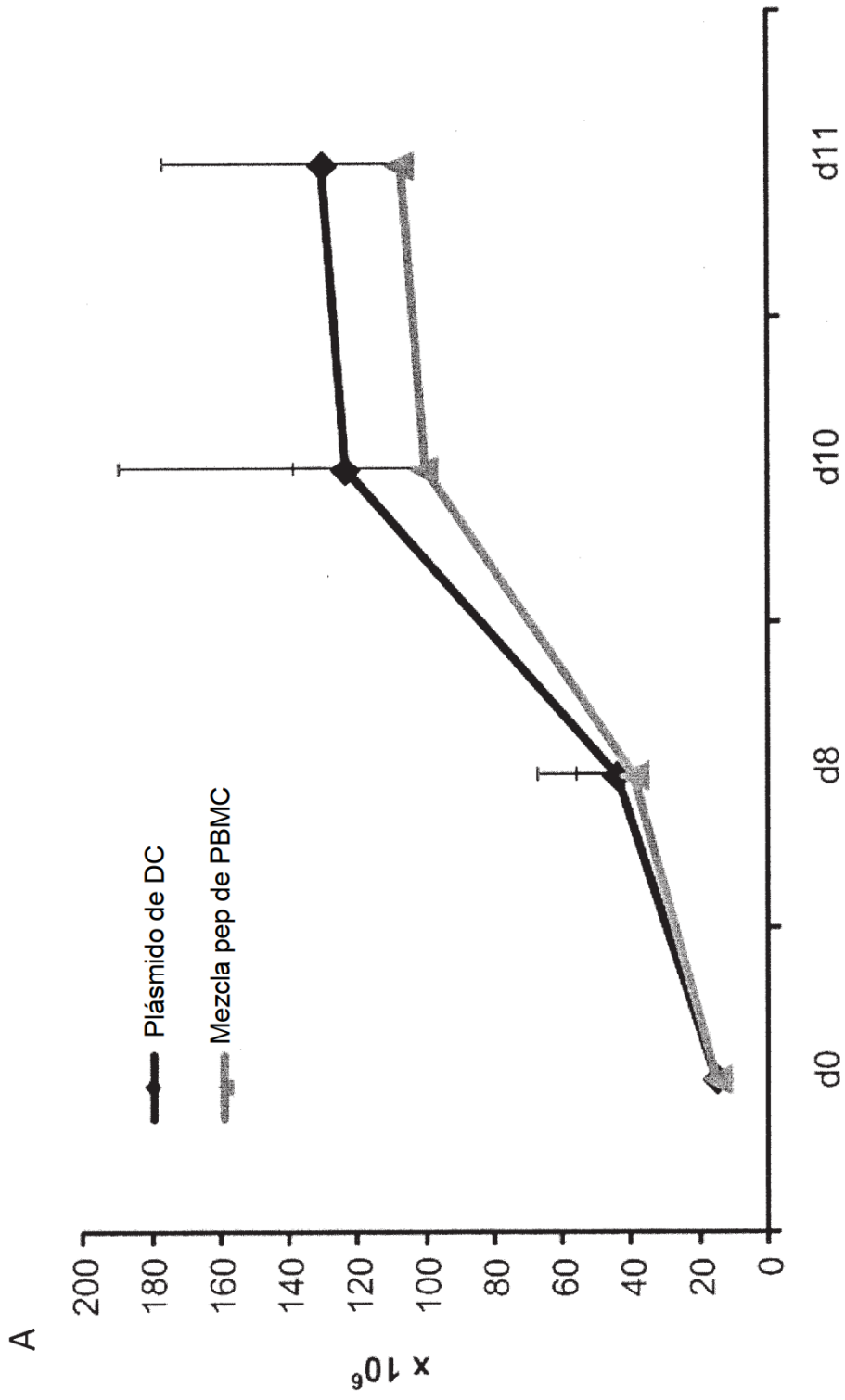


FIG. 2

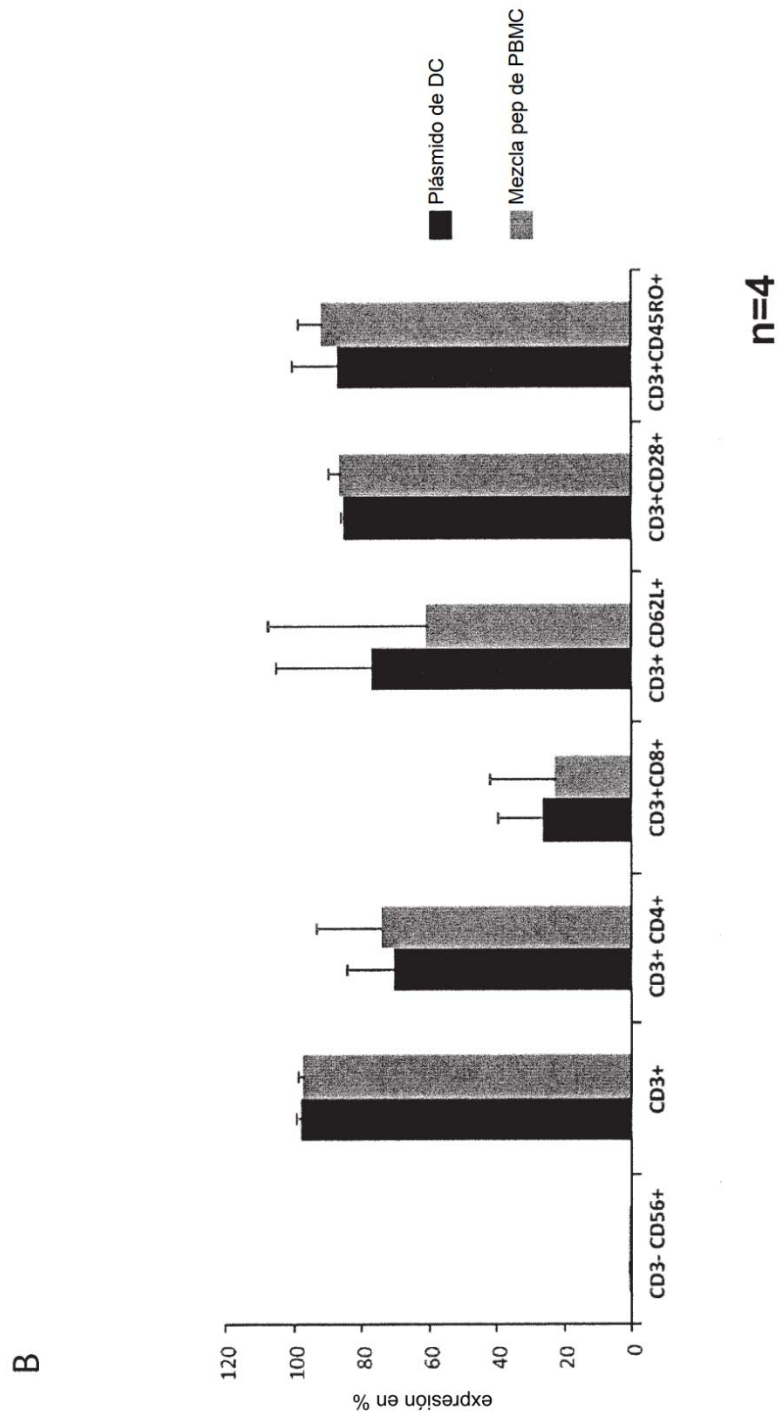


FIG. 2

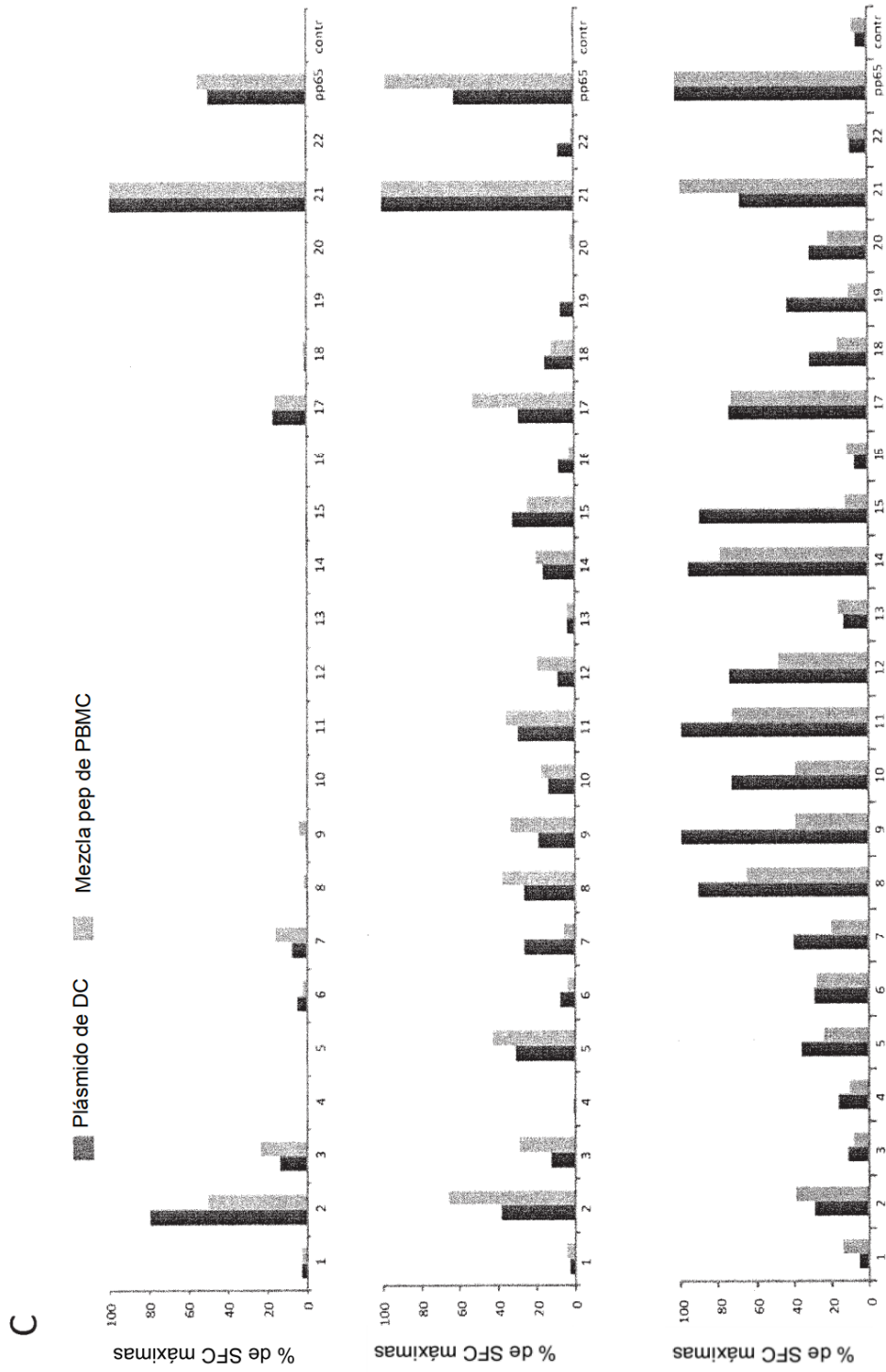


FIG. 2

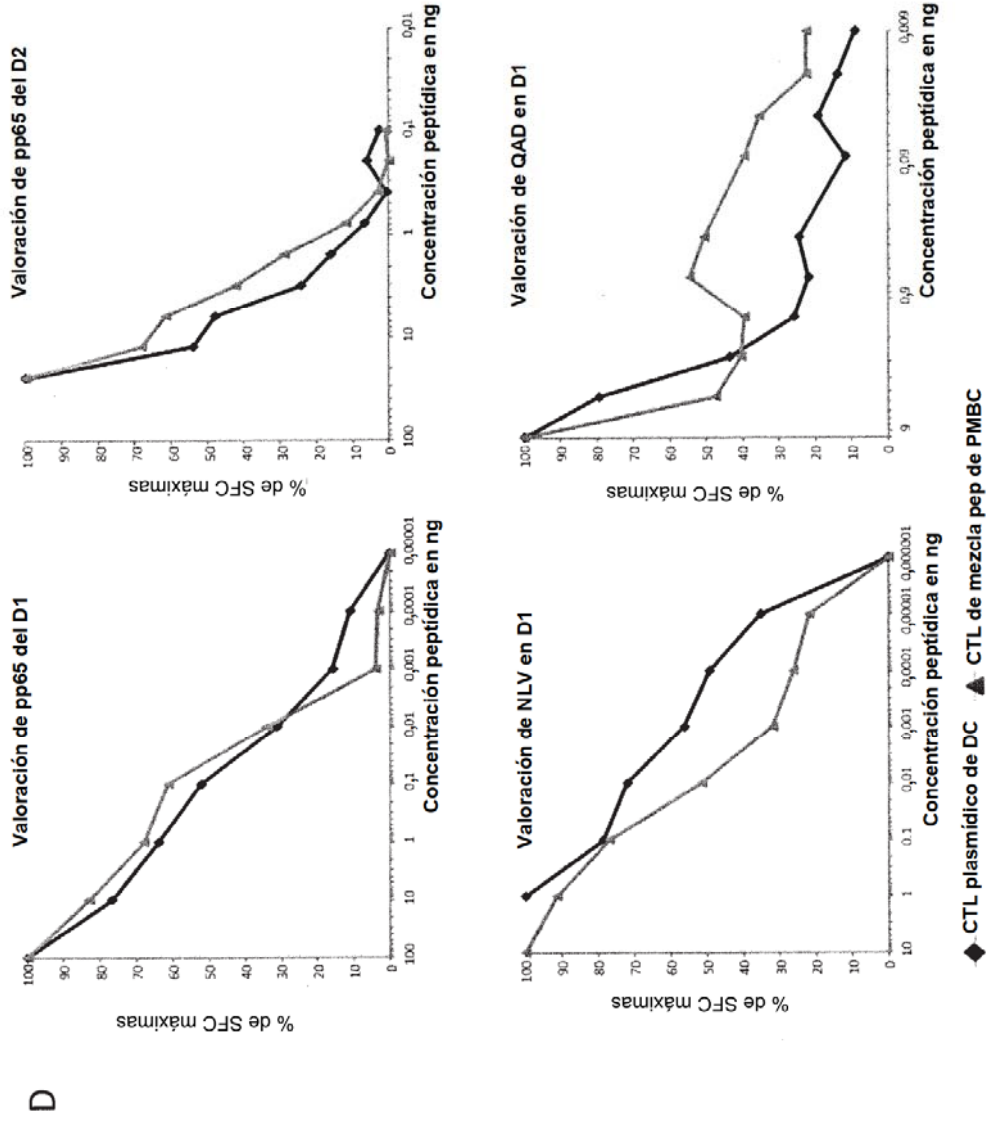


FIG. 2

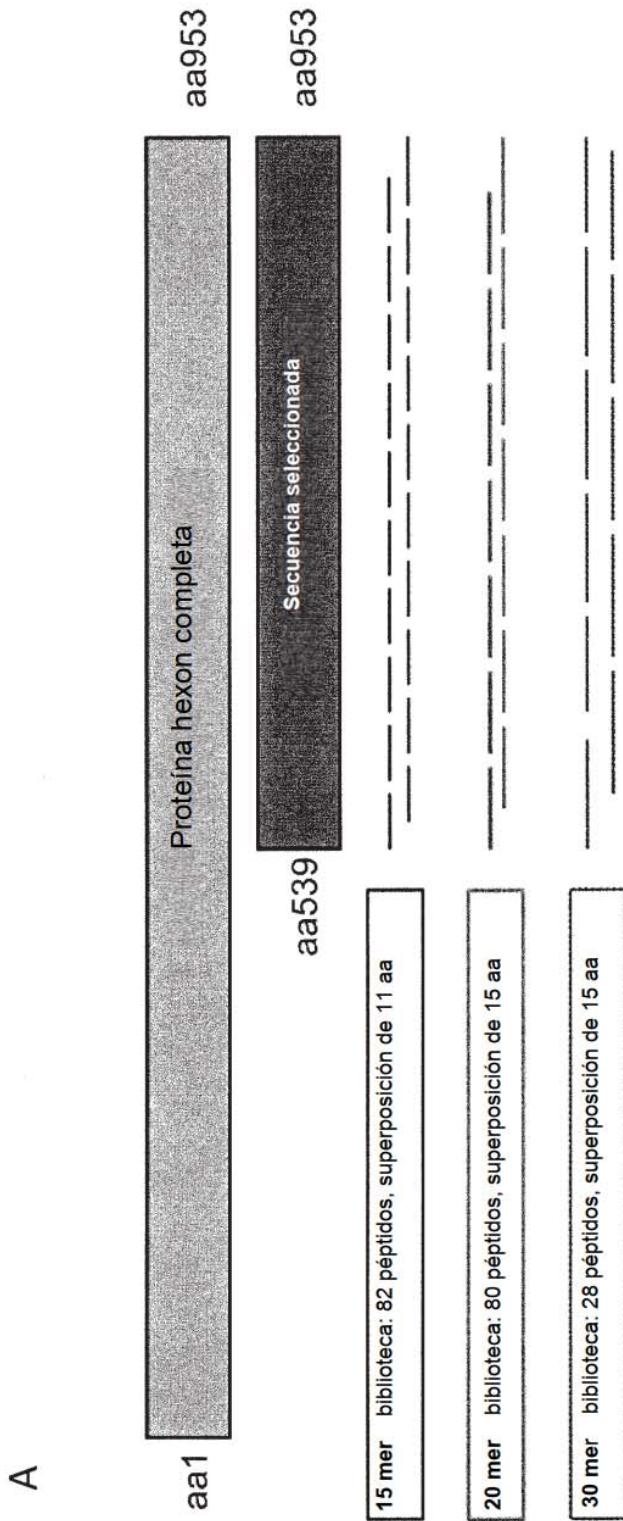


FIG. 3



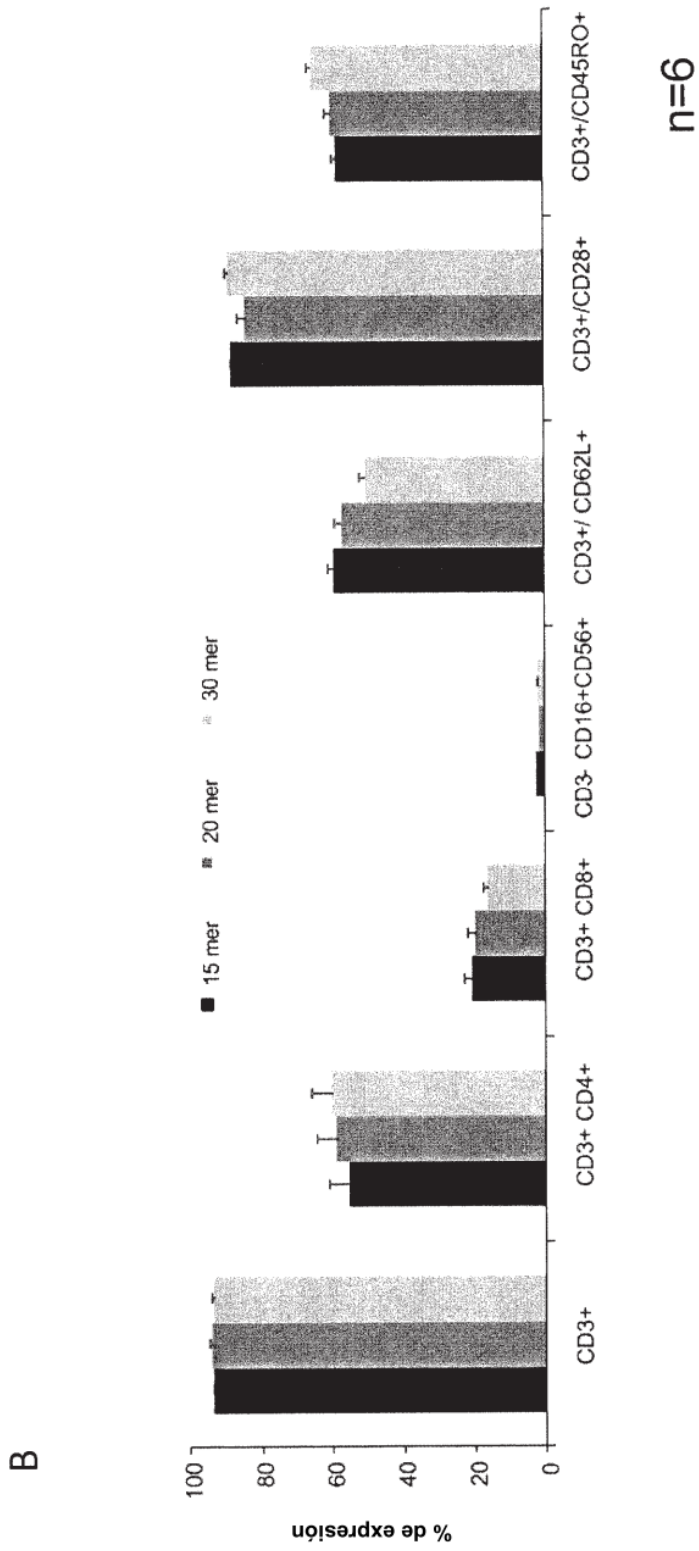


FIG. 3

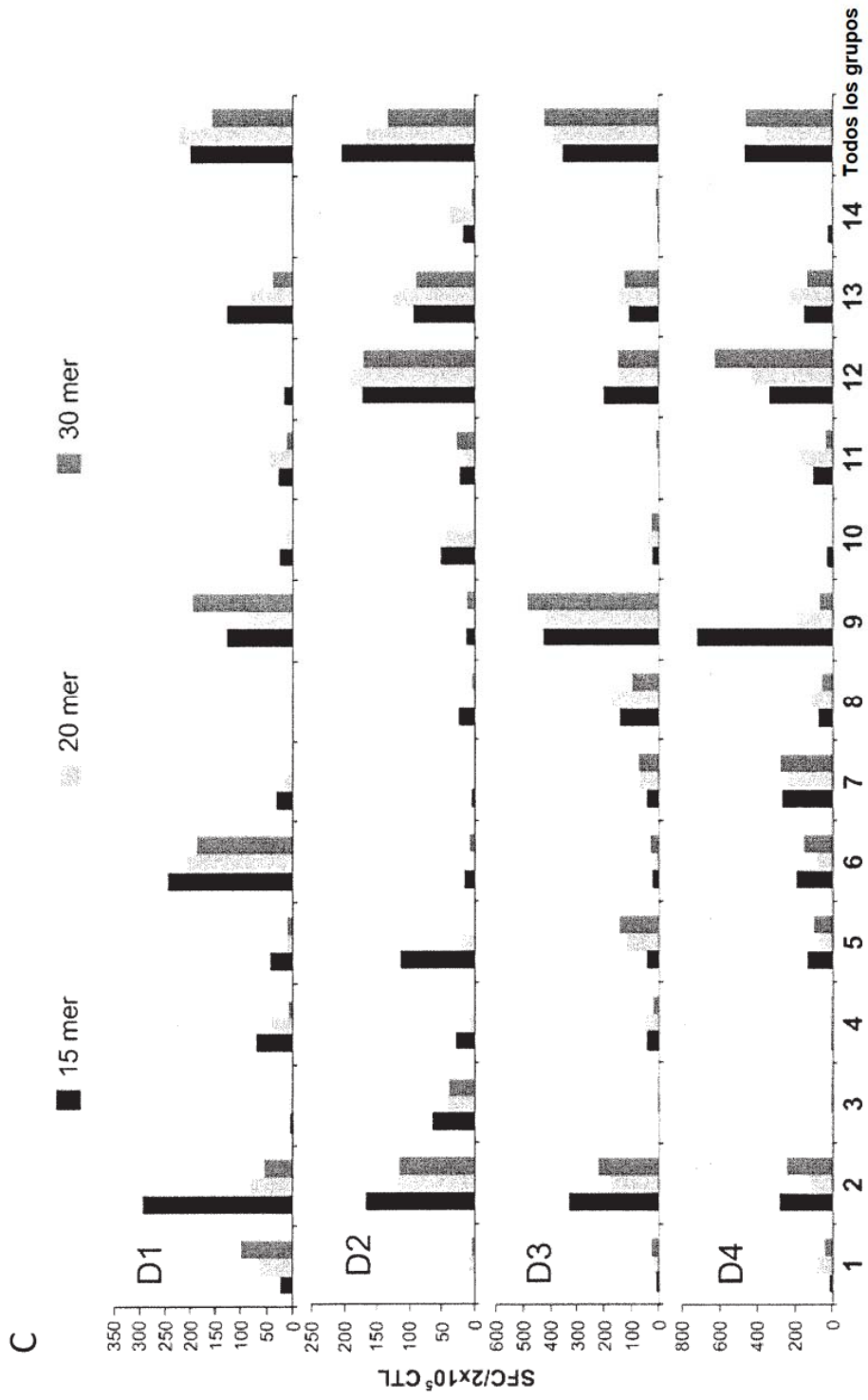


FIG. 3

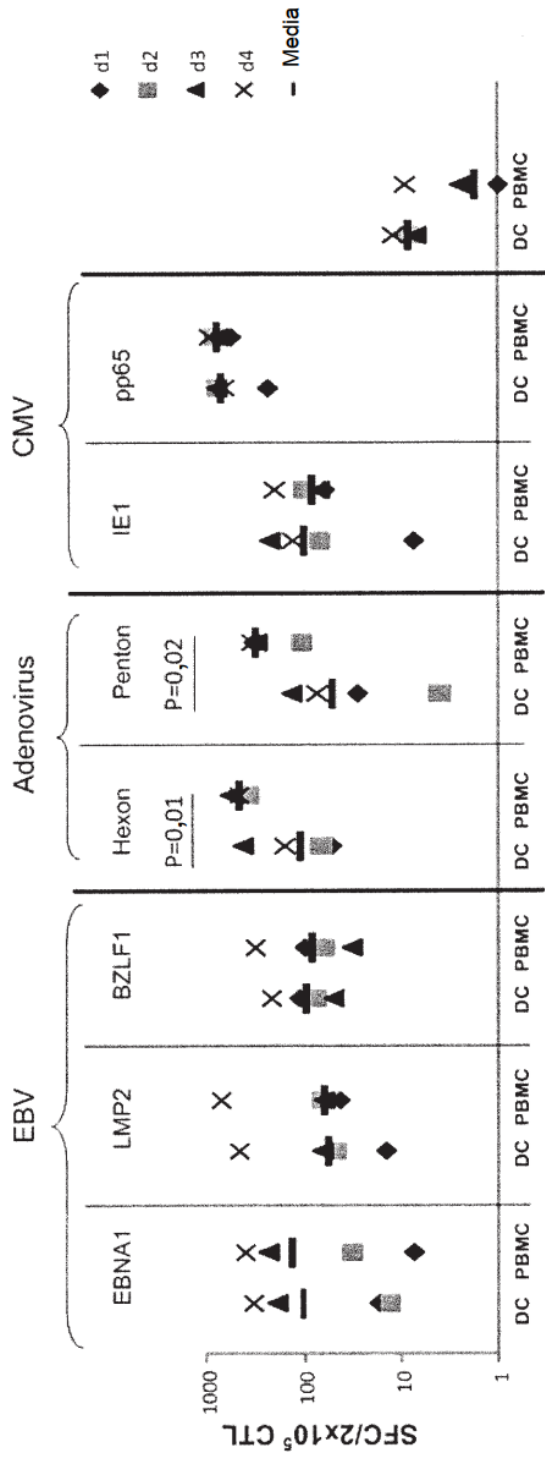


FIG. 4

A

	Adv (Hexon, Penton)	CMV (IE1, pp65)	EBV (EBNA1, LMP2, BZLF1)	BKV (LT, VP1)	RSV (N,F)	Flu (MP1, NP1)	HHV6 (U14, U90)
<b>Condición A:</b> virus únicos							
<b>Condición B:</b> virus inmunodominantes frente a subdominantes	inmunodominantes <b>CMV+ RSV+Flu+HHV-6</b>			subdominantes <b>Adv+ EBV+ BKV</b>			
<b>Condición C:</b> virus líticos frente a latentes	líticos <b>Adv + RSV + Flu</b>			latentes <b>CMV + EBV + HHV6 +BKV</b>			
<b>Condición D:</b> todos los virus/ antígenos combinados	<b>Adv + CMV+ EBV+BKV+ RSV+ Flu+ HHV-6</b>						

FIG. 5

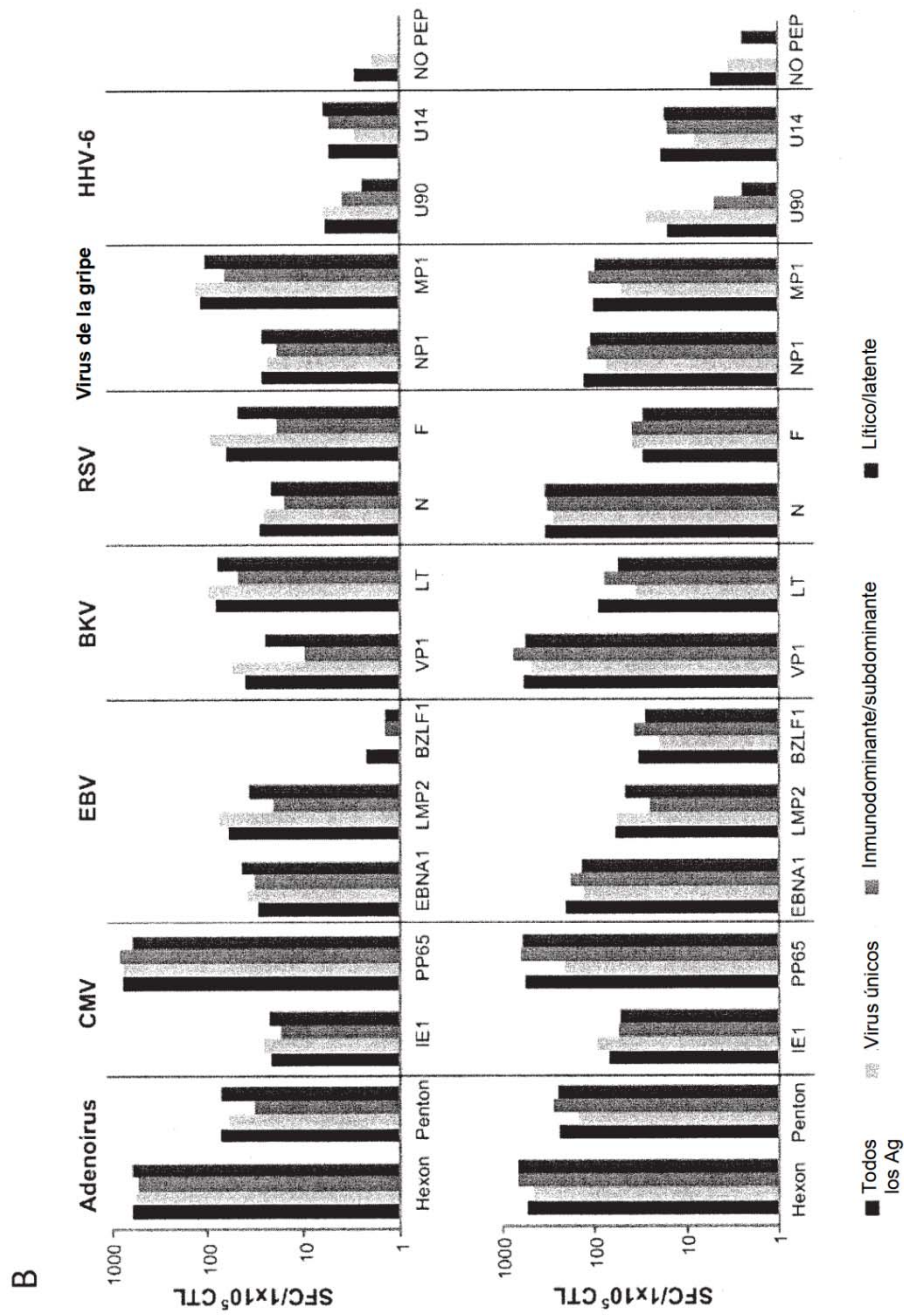


FIG. 5

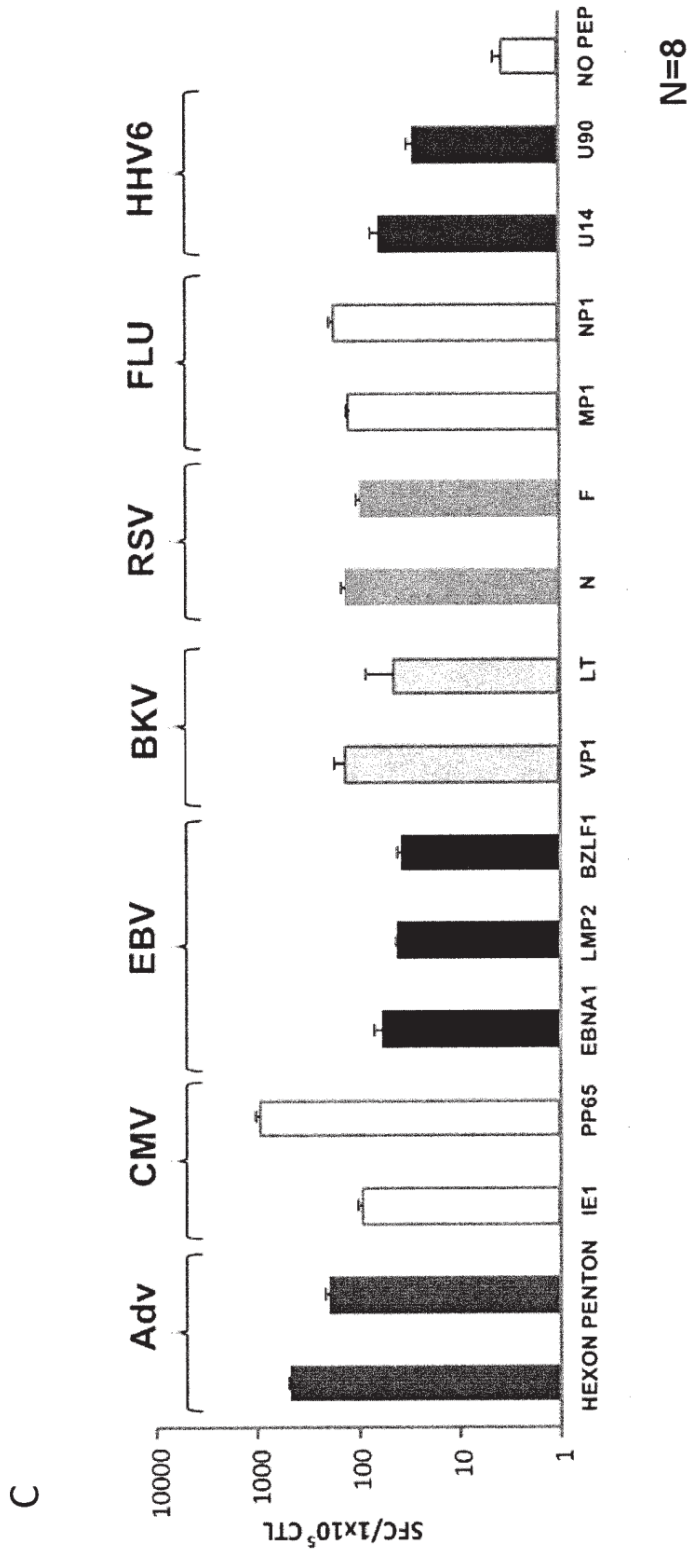


FIG. 5



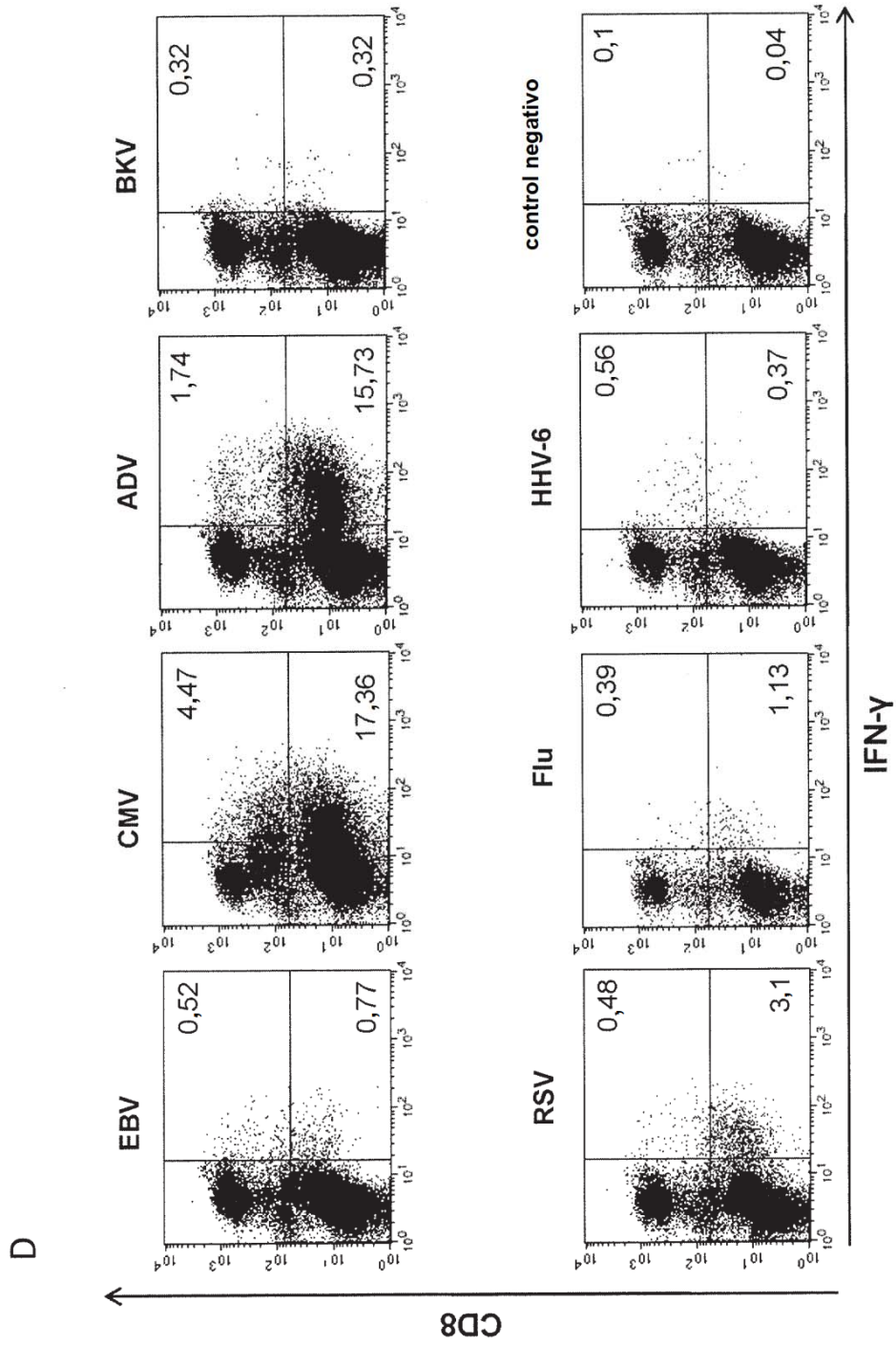


FIG. 5

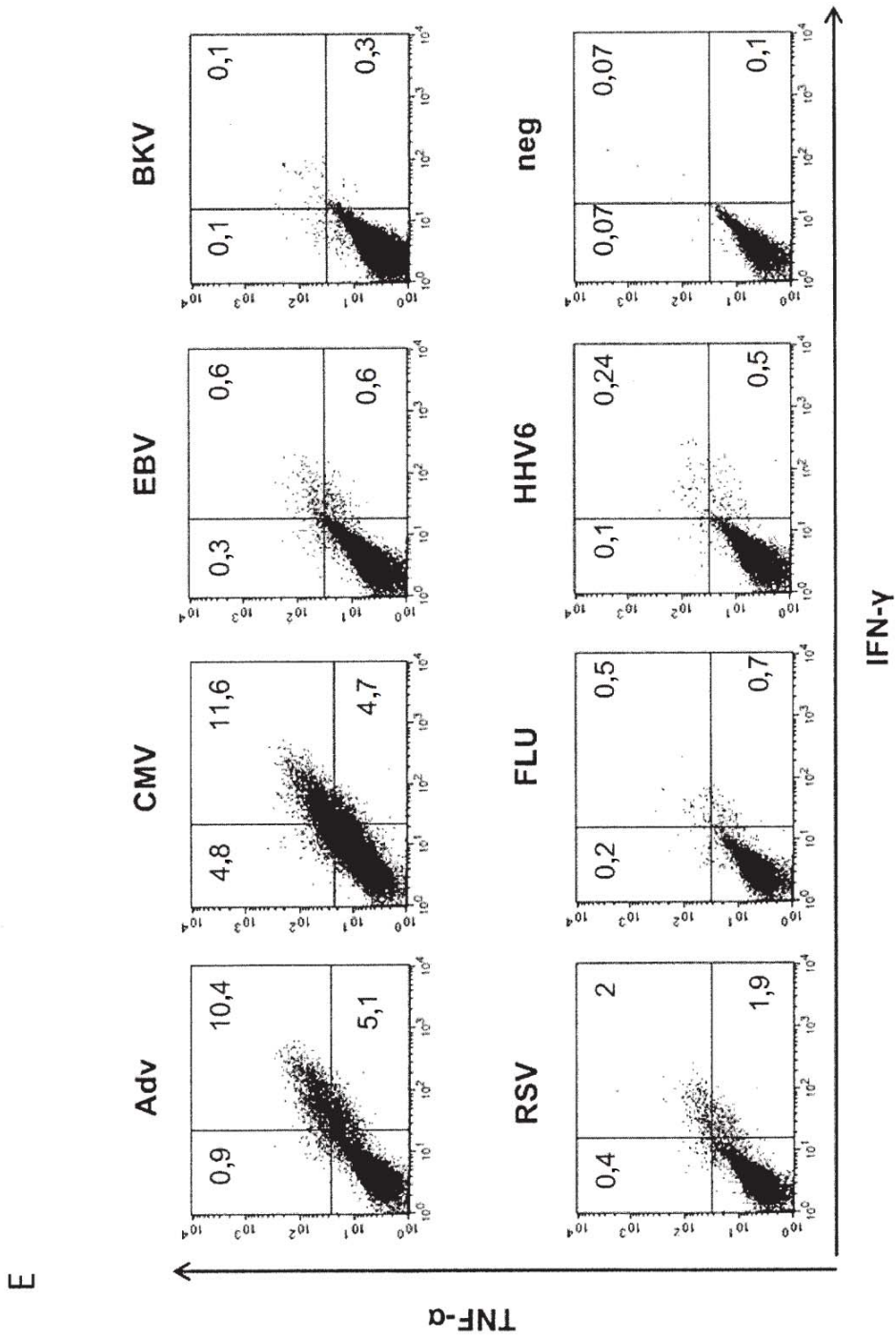


FIG. 5



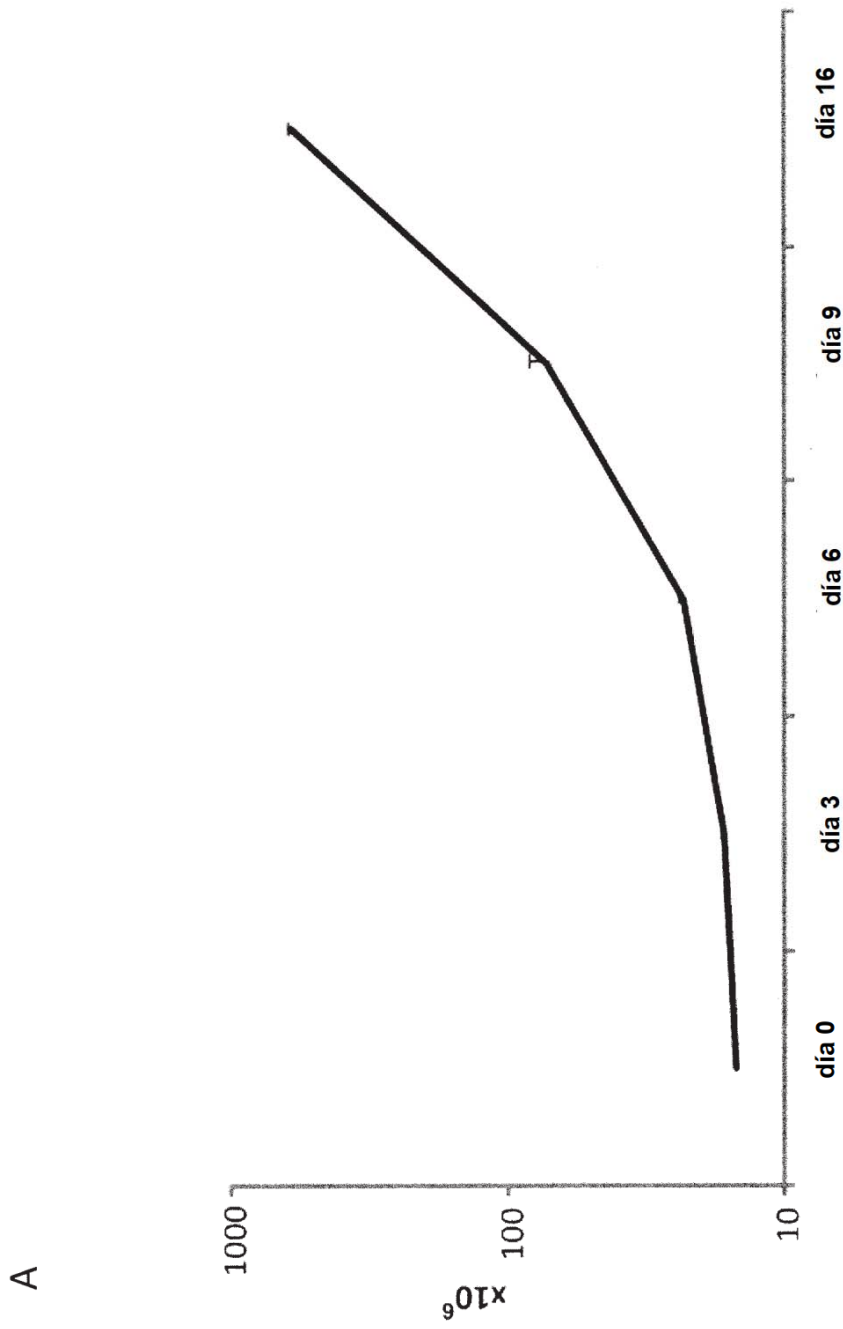


FIG. 6

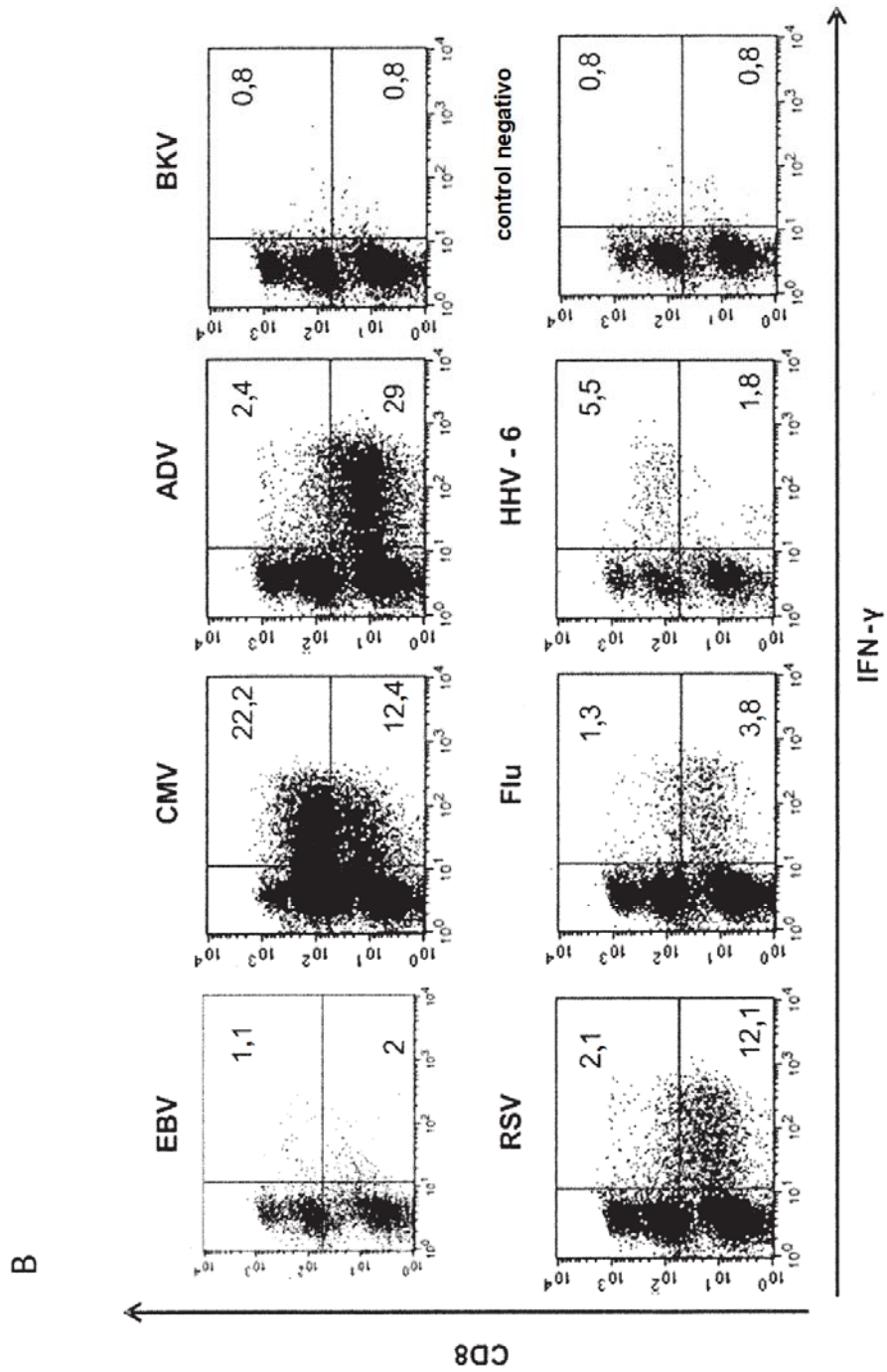


FIG. 6

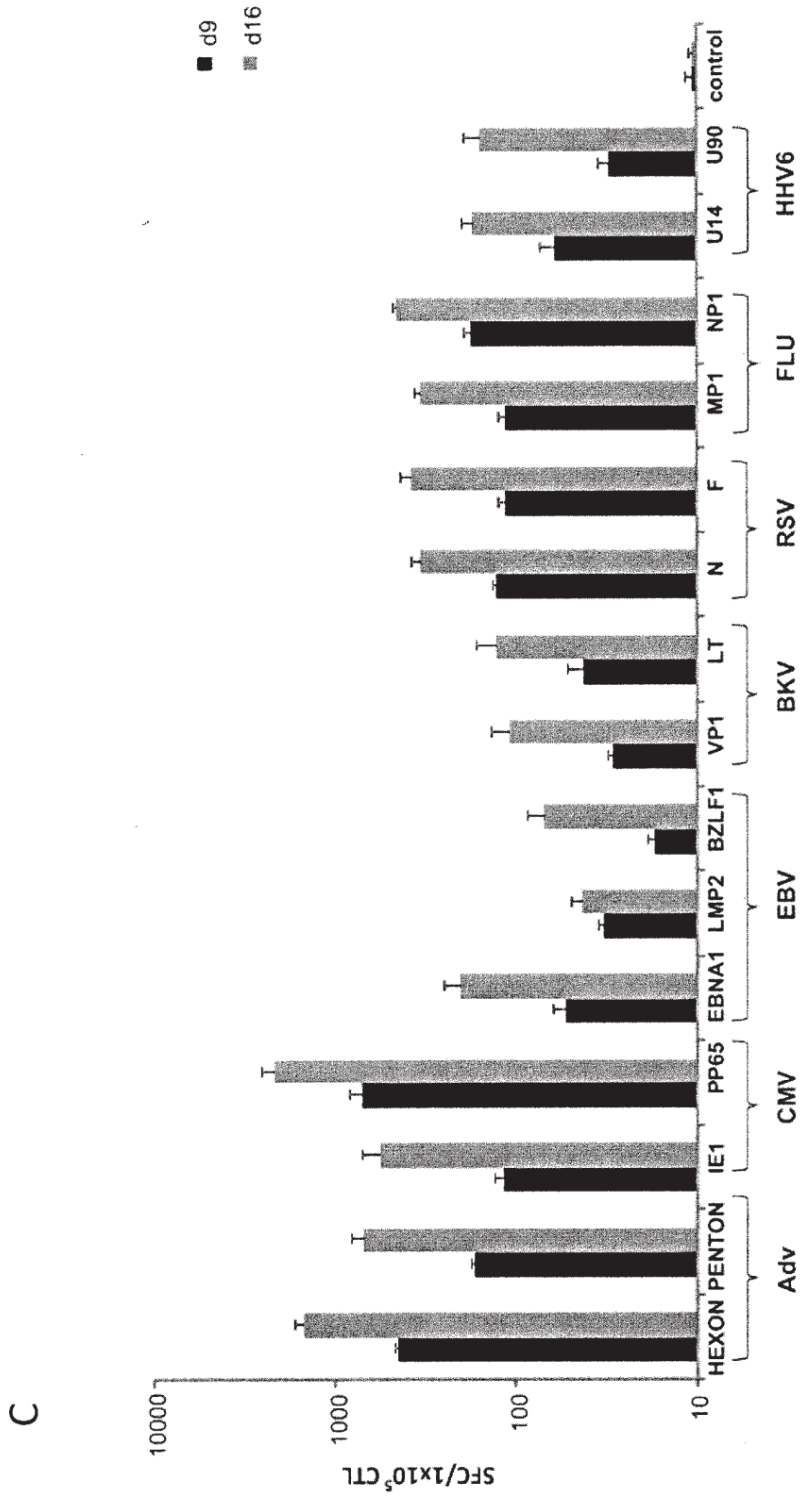


FIG. 6

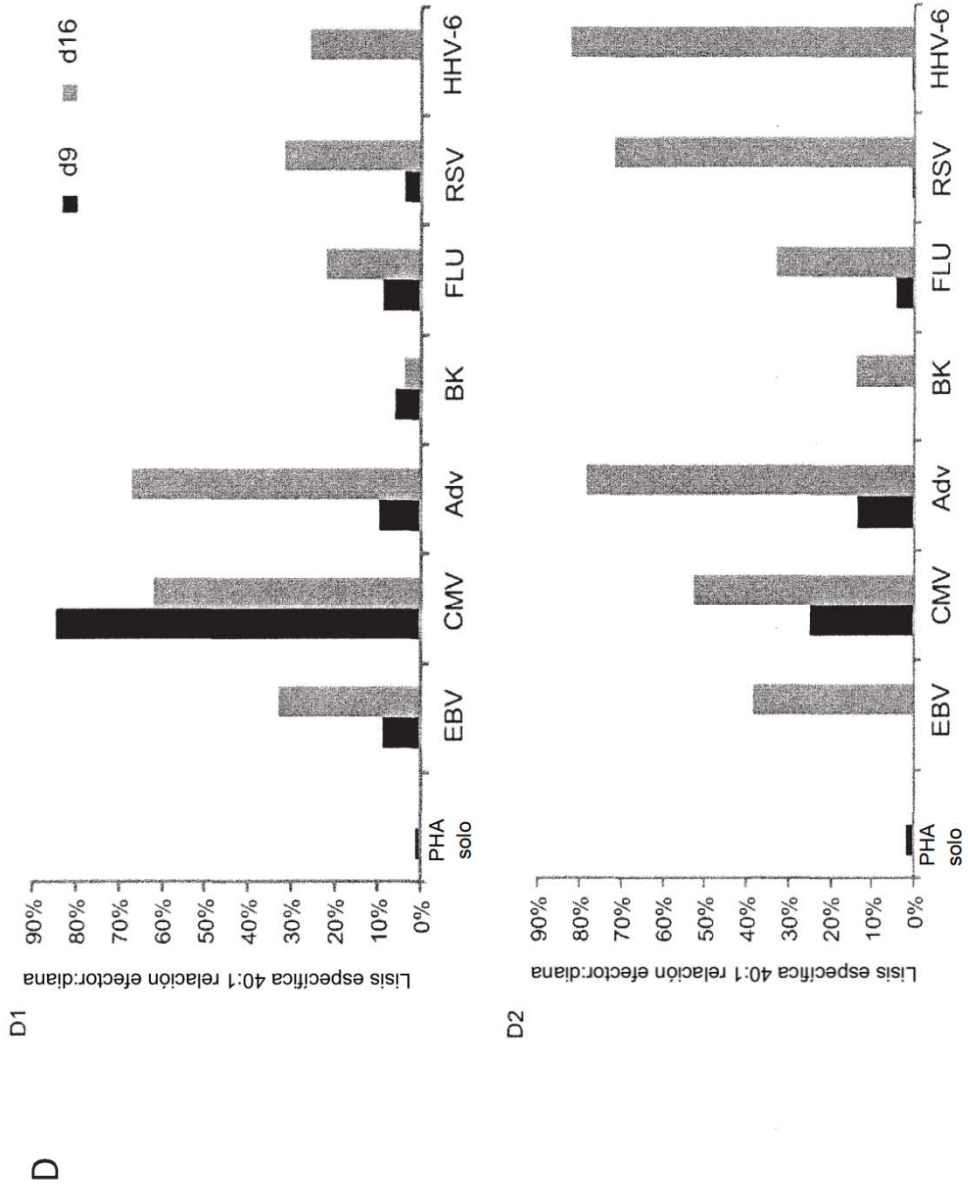


FIG. 6

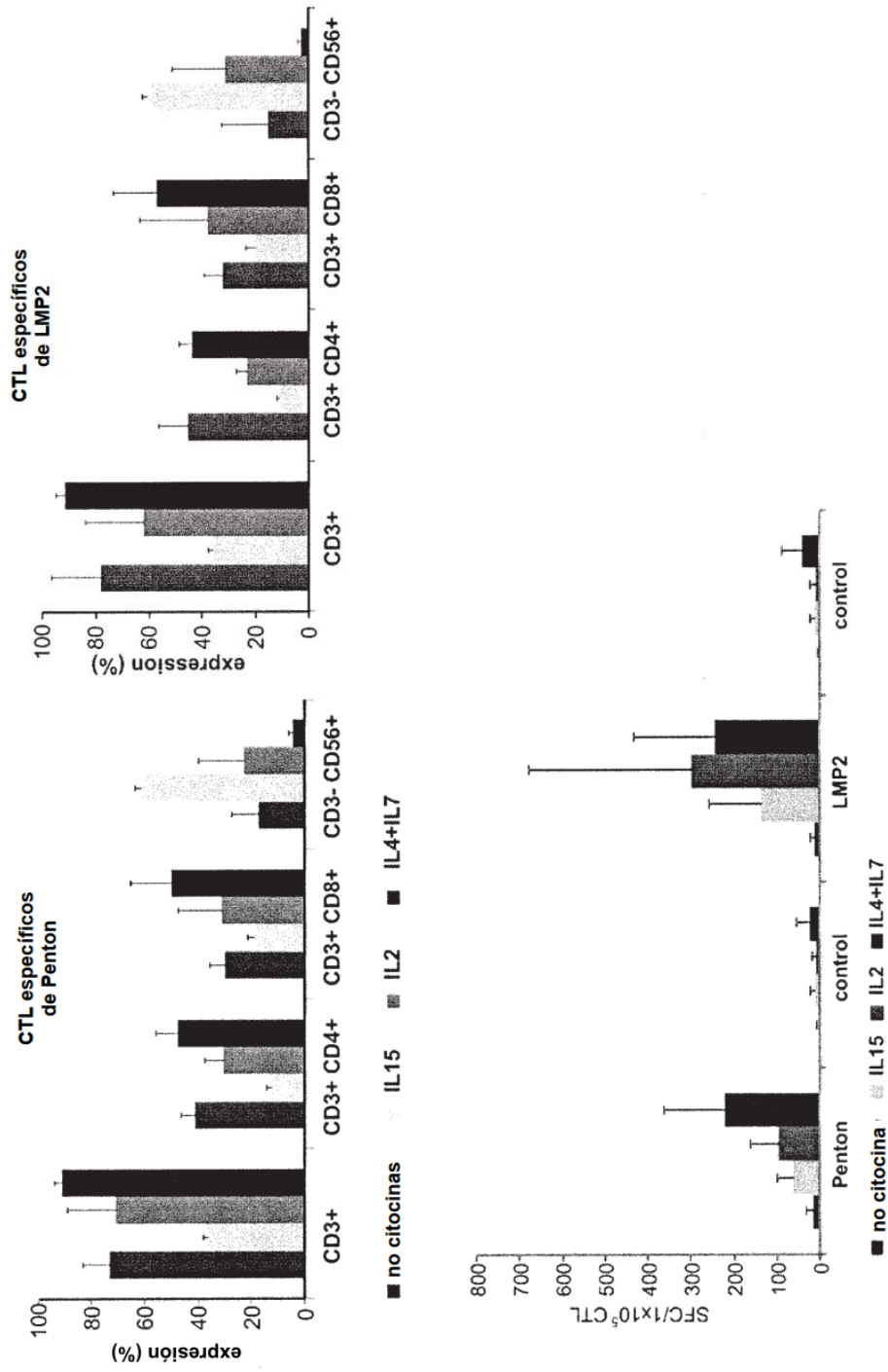


FIG. 7

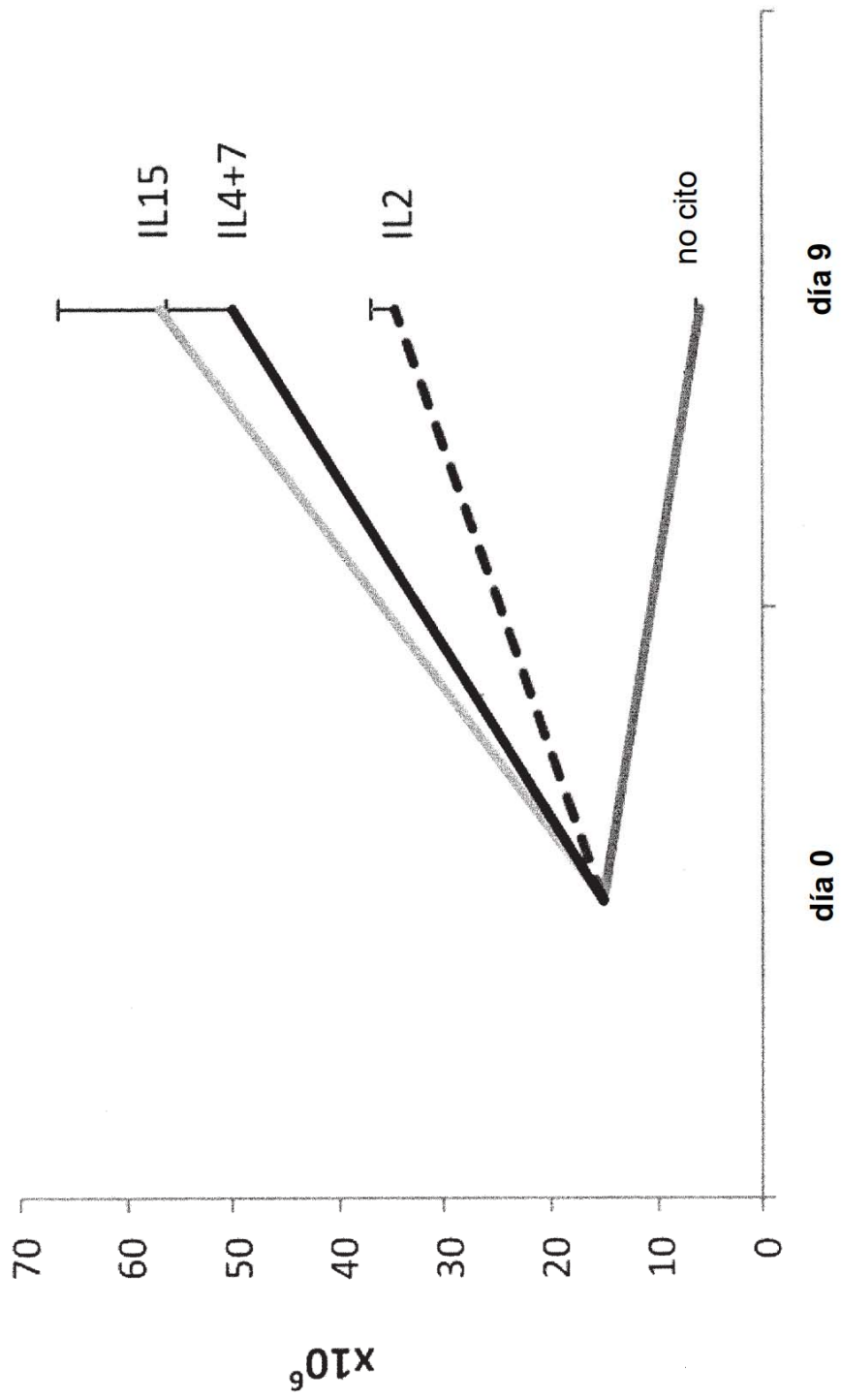


FIG. 8

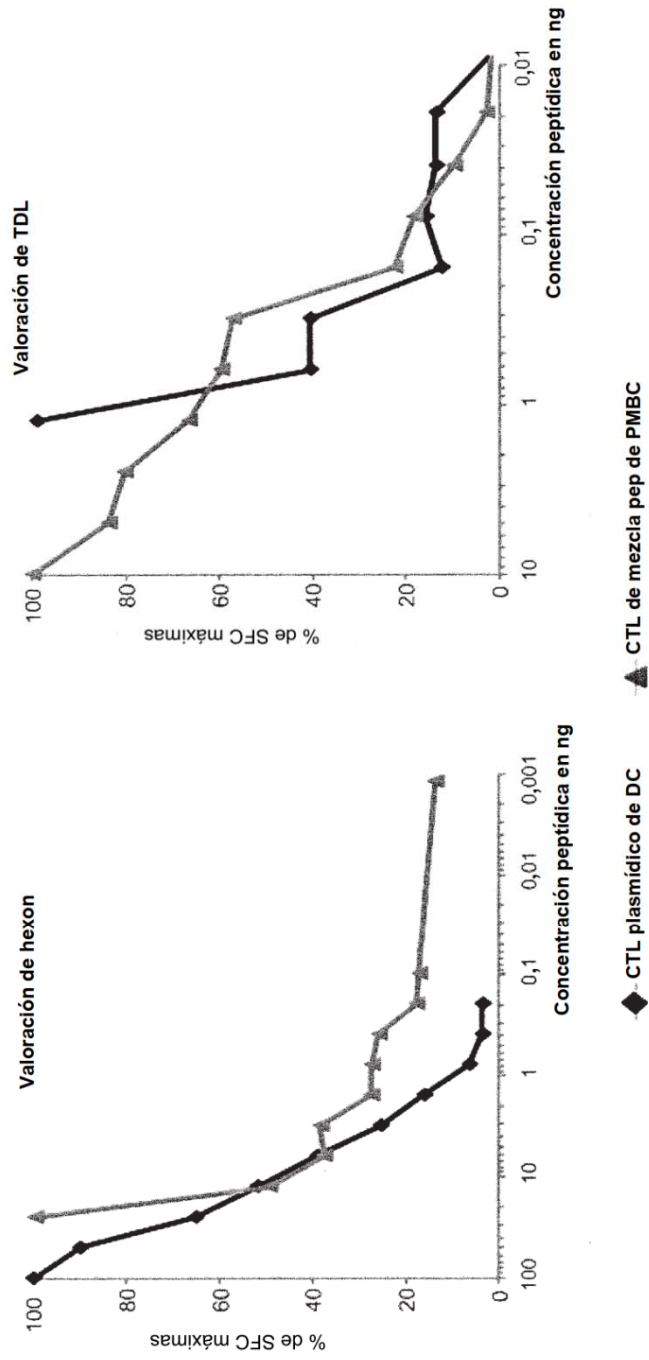


FIG. 9

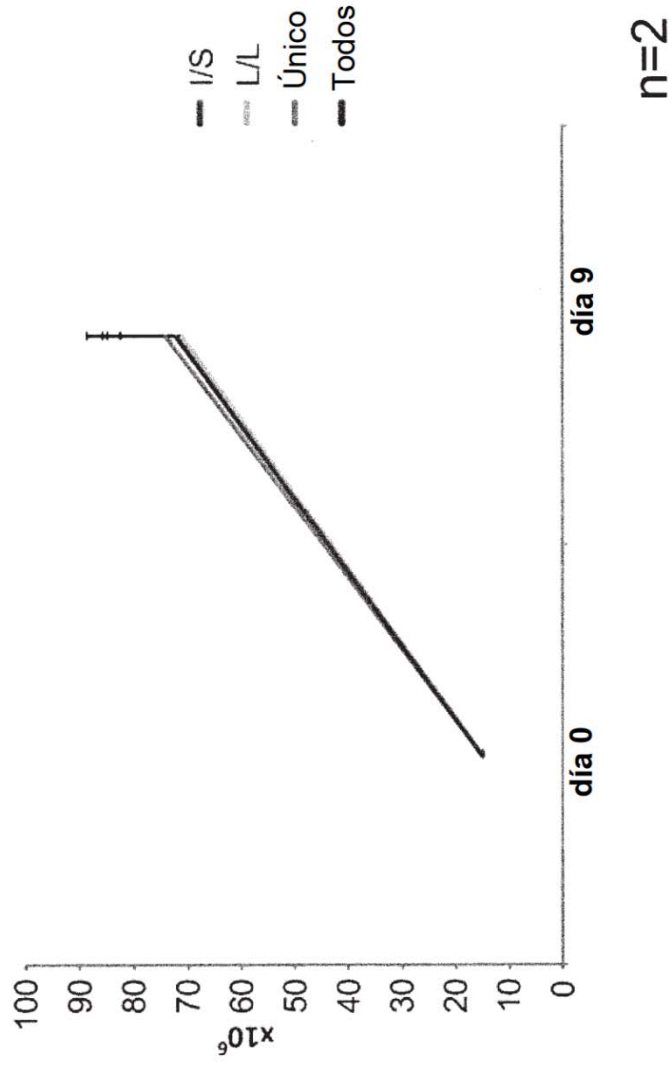


FIG. 10



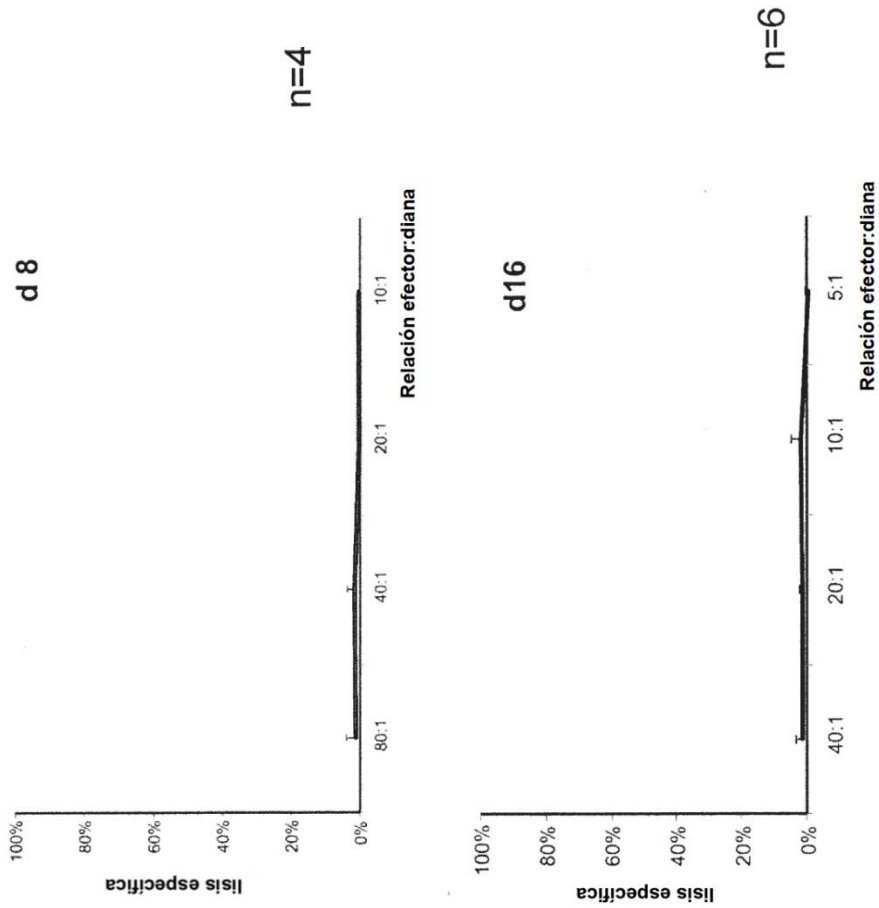


FIG. 11