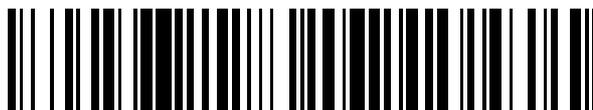


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 123**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

A61K 39/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2005 PCT/AU2005/001873**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2006 WO06060878**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2005 E 05815888 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 1827604**

54 Título: **Métodos y composiciones para inmunoterapia adoptiva**

30 Prioridad:

10.12.2004 AU 2004907072

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

11.06.2020

73 Titular/es:

**PETER MACCALLUM CANCER INSTITUTE
(100.0%)**

**Smorgon Family Building St Andrews Place
East Melbourne VIC 3002, AU**

72 Inventor/es:

**TRAPANI, JOSEPH A.;
SMYTH, MARK J.;
DARCY, PHILIP K. y
KERSHAW, MICHAEL H.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 766 123 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

Métodos y composiciones para inmunoterapia adoptiva

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la inmunoterapia. Más específicamente, la invención se refiere a la inmunoterapia adoptiva por la que las células inmunitarias del paciente se retiran, se modifican para que desencadenen una respuesta inmunitaria contra un antígeno diana específico, y luego se administran al paciente. La invención proporciona nuevos métodos y composiciones que dan lugar a respuestas inmunitarias mejoradas contra antígenos tales como los que se asocian con tumores y agentes infecciosos.

Antecedentes de la invención

15 El sistema inmunitario está diseñado para dirigirse a un gran número de antígenos ajenos tales como los representados por alérgenos y agentes patógenos. Las respuestas inmunitarias contra antígenos específicos se basan en los glóbulos blancos sanguíneos, y específicamente en las poblaciones de células B y células T. Las respuestas de célula B dan como resultado normalmente la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno mientras que las células T están implicadas en respuestas mediadas por células.

20 Las células T se subclasifican en dos poblaciones amplias. Las células T auxiliares se identifican por el marcador de superficie CD (de designación de agrupamiento) 4 y están implicadas principalmente en la ayuda a la producción de anticuerpos y la introducción de distintas respuestas inmunitarias. Las células T citotóxicas se distinguen por el marcador CD8 y tienen un papel importante en el reconocimiento, destrucción y eliminación de células tumorales y células infectadas con virus, pero no producen ningún anticuerpo que reaccione específicamente con un antígeno. Las células T citotóxicas reconocen y actúan directamente sobre los antígenos (normalmente péptidos antigénicos) de una célula diana que se asocian con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de Clase I presentes en la superficie de la membrana de la célula diana. El receptor de célula T (TCR) que existe sobre la superficie de la membrana de la célula T citotóxica reconoce específicamente los péptidos antigénicos mencionados anteriormente y las moléculas del MHC de Clase I (y determina si el péptido antigénico es "propio" o "no propio"). Una vez que la célula diana se une establemente, y tiene lugar la señalización apropiada en la célula T, la célula diana entonces es destruida y eliminada específicamente por la célula T citotóxica.

35 Algunas estrategias inmunoterapéuticas actuales implican la transferencia adoptiva a un paciente de células T citotóxicas modificadas *in vitro* para tener la capacidad de reaccionar específicamente con un antígeno de interés. Aunque la inmunoterapia adoptiva ha mostrado resultados prometedores en la clínica, particularmente en pacientes con melanoma, existen considerables limitaciones en este método. Un problema principal es la falta de persistencia de las células modificadas en el sitio de la enfermedad, en la sangre o en un órgano linfóide, dando lugar a la erradicación incompleta de las células que tienen el antígeno. También, muy pocas de las células que se re-infunden son capaces de circular con precisión hasta los depósitos tumorales. Otro problema es que la respuesta inmunitaria proporcionada por los métodos de inmunoterapia adoptiva de la técnica anterior no previene el establecimiento de un nuevo tumor o infección por recurrencia del mismo tumor o infección.

45 Hasta la fecha, la aplicación de la inmunoterapia adoptiva ha fallado a la hora de demostrar una eliminación robusta de las células cancerosas y su uso está incluso más limitado en cánceres refractarios tales como carcinomas de mama, colon y ováricos. Se han propuesto varios factores para tener en cuenta en las pobres respuestas antitumorales señaladas en la técnica anterior, incluyendo la regulación negativa del MHC de clase I o clase II/péptido en la superficie celular (Garrido et al, 1993); y los efectos inmunosupresores de las células T inmunorreguladoras (Steitz et al, 2001; Shimizu et al, 1999).

50 Es un aspecto de la presente invención aliviar o superar un problema de la técnica anterior proporcionando composiciones y métodos que den lugar a respuestas inmunitarias mejoradas en inmunoterapia adoptiva.

55 La exposición de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos y similares se incluyen en la presente memoria descriptiva solamente con fines de proporcionar un contexto para la presente invención. No sugiere o representa que alguno o todos de estos materiales formen parte de la base de la técnica anterior o fueran del conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención como si existieran antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud. La invención se define por las reivindicaciones y cualquier otro aspecto o realización expuestos en el presente documento que no se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones son solamente a modo de información.

Sumario de la invención

65 Teng, M W L et al., Human Gene Therapy, Vol. 15(7), julio de 2004, páginas 699-708, describe la inmunoterapia del cáncer utilizando linfocitos T humanos modificados genéticamente que se suministran sistemáticamente.

Kershaw, M H et al., J. Immunology Vol. 173(3), 1 agosto de 2004, páginas 2143-2150, describe células T modificadas genéticamente como una terapia adyuvante superior para el cáncer metastático.

5 Altenschmidt U et al., J. Immunology Vol. 159(11), 1 diciembre de 1997, páginas 5509-5515, informa que la transferencia adoptiva de linfocitos T activados dirigidos *in vitro* da como resultado la regresión tumoral total.

Altenschmidt U et al., Clinical Cancer Research, Vol. 2(6), 1 de junio de 1996, páginas 1001-1008, describe la citólisis de células tumorales que expresan los receptores NEW/ERBB-2, ERBB-3 y ERBB-4 mediante linfocitos T intactos dirigidos genéticamente.

10 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición para la producción de una respuesta inmunitaria adoptiva contra una célula diana en un sujeto, incluyendo dicha composición una célula T CD4+ modificada para que exprese una molécula capaz de unirse a un antígeno en la célula diana, y una célula T CD8+ modificada para que exprese una molécula capaz de unirse a un antígeno en la célula diana; en la que la relación de células T CD4+ respecto a células T CD8+ es mayor de aproximadamente 1:3 y menor de aproximadamente 3:1.

15 Los solicitantes han descubierto que, en experimentos de transferencia adoptiva *in vivo*, la administración de un número suficiente de antígeno CD4+ modificado en combinación con células CD8+ da lugar a un aumento significativo de la respuesta inmunitaria contra una célula diana. Se ha demostrado en el presente documento que la inyección de células T CD4+ y CD8+ modificadas para que expresen una molécula capaz de unirse a un antígeno asociado con un tumor da lugar a una mejora significativa de la supervivencia de sujetos que tienen metástasis pulmonares establecidas, en comparación con la transferencia de células T modificadas (sobre todo CD8+) derivadas del bazo sin fraccionar. De manera importante, las respuestas antitumorales en los sujetos se correlacionan con la persistencia y localización de las células T modificadas en el sitio del tumor y en la sangre y el bazo. Los solicitantes han demostrado adicionalmente en el presente documento que los sujetos tratados con células T CD4+ y CD8+ modificadas que sobreviven a un desafío tumoral primario podrían rechazar un nuevo desafío posterior con el mismo tumor. Los estudios desvelados en el presente documento demuestran que la ventaja terapéutica de la transferencia combinada de célula T CD4+ y CD8+ modificadas genéticamente específicas de antígeno aumentan significativamente las estrategias adoptivas de células T para el tratamiento de afecciones tales como el cáncer y las enfermedades infecciosas.

20 En una realización preferida del método, la respuesta inmunitaria adoptiva implica la interacción de las células T modificadas con la célula diana en un entorno completamente *in vivo*. Los solicitantes demuestran en el presente documento por primera vez la transferencia adoptiva de células T CD4+ y células CD8+ modificadas directamente en un sujeto, el desplazamiento de las células T a la célula diana, interactuando las tres células para dar lugar a una respuesta inmunitaria adoptiva. Por el contrario, los métodos descritos en la técnica anterior necesitan que las células T modificadas y la célula diana interactúen en un entorno *in vitro* antes de su administración al sujeto. Los métodos descritos en la técnica anterior no son aplicables clínicamente y solo sirven para demostrar el principio básico de la transferencia celular adoptiva.

40 Además, en la generación de una respuesta inmunitaria adoptiva mejorada, los solicitantes han demostrado que el aumento de la proporción de células T CD4+ modificadas podrían erradicar más eficazmente la enfermedad.

45 Preferentemente, el número eficaz de células CD4+ modificadas será mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, y aproximadamente 9×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} células CD4+.

50 Preferentemente, el número eficaz de células CD8+ será mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, y aproximadamente 9×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} células CD8+.

55 En una realización altamente preferida del método, el número eficaz de células CD4+ modificadas es aproximadamente de 5×10^6 y el número eficaz de células CD8+ modificadas es aproximadamente de 5×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} de cada una de las células CD4+ y CD8+.

60 Aunque los solicitantes han identificados números eficaces de células CD4+, también se considera que la relación de células modificadas CD4+ respecto a CD8+ puede ser importante. En un método preferido, la relación de células CD4+ respecto a células CD8+ administradas al sujeto es mayor de aproximadamente 1:9 y menor de aproximadamente 9:1. Más preferentemente, la relación es mayor de aproximadamente 1: 3 y menor de aproximadamente 3:1. En una realización altamente preferida del método la relación es aproximadamente de 1:1.

65 Preferentemente, la molécula capaz de unirse al antígeno incluye secuencias del TCR- ζ y/o dominios de señalización co-estimulantes de CD28.

El experto entenderá que la presente invención es esencialmente genérica y será útil para el direccionamiento de una respuesta inmunitaria mediada por una célula contra un amplio intervalo de antígenos tales como los que se encuentran en o sobre las células tumorales, o los antígenos que se encuentran en o sobre las células infectadas con un virus (por ejemplo, un VIH), una micobacteria (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*) o un parásito (por ejemplo, *Plasmodium falciparum*). Sin embargo, en una realización preferida del método, el antígeno es un antígeno asociado con una célula cancerosa.

Preferentemente, la célula modificada persiste localmente en el sitio del tumor o la infección en el sujeto a largo plazo. En una forma del método, las células modificadas persisten en el sitio del tumor o la infección durante al menos 100 días.

En una forma preferida del método, la respuesta inmunitaria adoptiva da lugar a la erradicación completa de la infección o el tumor.

Aunque serán aceptables varias formas de administración de las células, una forma preferida del método proporciona que la administración se mediante inyección sistémica. La capacidad para administrar las células sistémicamente revela una ventaja adicional del presente método ya que los solicitantes han demostrado la capacidad de las células para viajar y depositarse en el sitio de la infección o el tumor u otra patología desde una localización remota. Al contrario que con la técnica anterior los solicitantes han demostrado la erradicación completa de un tumor establecido en un sitio distante a continuación de la inyección sistémica de células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas de ratón. Además, los estudios demuestran la persistencia y función a largo plazo de estas células T modificadas genéticamente después de un nuevo desafío con el tumor.

Preferentemente, la respuesta inmunitaria adoptiva es capaz de prevenir el establecimiento de un nuevo tumor o infección. Los experimentos que se describen en el presente documento demuestran por primera vez *in vivo* que la provisión de células T CD⁺ modificadas específicas de antígeno puede mejorar significativamente las respuestas antitumorales, mantener la persistencia de las células T transferidas e inducir una potente respuesta de reclutamiento después de un nuevo desafío con el tumor. Esto es un avance sustancial sobre los métodos de inmunoterapia adoptiva de la técnica anterior.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para la inmunoterapia adoptiva que incluye una célula T CD4⁺ modificada y una célula T CD8⁺ modificada.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para la inmunoterapia adoptiva que consiste en una célula T CD4⁺ modificada y una célula T CD8⁺ modificada. Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que no es necesario incluir una célula diana en la composición antes de la administración al sujeto. Esto es una ventaja considerable ya que no es necesario retirar del sujeto el tejido que contiene la célula diana.

En un aspecto adicional más, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o prevención de un cáncer o una infección incluyendo dicho método la administración a un animal que lo necesite de una célula T CD4⁺ modificada y una célula T CD8⁺ modificada en el que la célula T CD4⁺ y la célula T CD8⁺ se modifican para que expresen una molécula capaz de unirse a un antígeno del cáncer o la infección. Se debería entender que el método es esencialmente de naturaleza genérica y se puede aplicar a muchas formas de cáncer o infección.

En un aspecto adicional más, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o prevención de un cáncer o una infección, incluyendo dicho método la administración a un animal que lo necesite de una composición descrita en el presente documento.

En un aspecto adicional más, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o prevención de un cáncer o una infección, incluyendo dicho método la administración a un animal que lo necesite de una composición descrita en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La **FIG. 1** muestra la expresión del receptor scFv-CD28- ζ en células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas primarias de ratón. Las células T esplénicas enriquecidas de ratones BALB/c se vaciaron en subconjuntos de células T CD8⁺ y CD4⁺ o se dejaron como células no fraccionadas antes de la transducción retroviral con el receptor scFv-CD28- ζ . Las células T transducidas no fraccionadas consistían en un 80-85 % de células T CD8⁺ y ~10 % de células T CD4⁺ (A) mientras que las poblaciones aisladas consistían en más del 90 % de CD8⁺ (C y G) o células T CD4⁺ (E e I). Se detectó la expresión del receptor scFv quimérico en las células T transducidas no fraccionadas (B), células T CD8⁺ (D) y CD4⁺ (F) mediante citometría de flujo después de la tinción con un mAb anti-marcaador y un anticuerpo de oveja anti-Ig de ratón marcado con PE (línea continua) o solo con el anticuerpo secundario marcado con PE (línea discontinua). Se detectó una expresión del receptor insignificante en poblaciones aisladas de células T CD8⁺ (H) y CD4⁺ (J) transducidas con el vector LXSXN vacío. Se obtuvieron resultados similares en diez experimentos.

La **FIG. 2** muestra la secreción, proliferación y citotoxicidad de citocinas específicas de antígeno por las células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas. Para evaluar la secreción de citocinas, las células T no fraccionadas (barras vacías), las células T CD8⁺ (barras de puntos) y las células T CD4⁺ (barras a rayas diagonales) transducidas con el receptor scFv-CD28- ζ o las células T no fraccionadas (barras sólidas), células T CD8⁺ (barras de líneas cruzadas) y células T CD4⁺ (barras con tiras horizontales) transducidas con receptor falso se co-cultivaron con medio solo o con células MDA-MB-435-erbB2 o células MDA-MB-435 parentales radiadas o estimuladas con mAb anti-CD3 y anti-CD28 unidos a la placa en placas de 12 pocillos durante 24 h. Se recolectaron los sobrenadantes y se evaluaron en cuanto a la producción de IFN- γ (A), GM-CSF (B), IL-4 (C) e IL-2 (D) mediante un ELISA. Los resultados se expresan como pg/ml de citocina secretada \pm SE para muestras por duplicado de tres experimentos representativos. Se evaluó la capacidad proliferativa de cada una de las poblaciones de células T transducidas en un ensayo de incorporación de [³H]-timidina en 72 h (E). Las células T no fraccionadas transducidas (barras vacías), las células T CD8⁺ (barras de puntos) y las células T CD4⁺ (barras a rayas diagonales) (barras sólidas) o las células T no fraccionadas transducidas en falso (barras sólidas), las células T CD8⁺ (barras de líneas cruzadas) y las células T CD4⁺ (barras de rayas horizontales) se incubaron con el medio solo o se estimularon con mAb anti-CD3 o anti-CD28 o mAb anti-marcador unidos a la placa durante 3 días. Los resultados se expresaron como medias \pm SE de muestras por triplicado y son representativos de tres experimentos. La función citolítica específica de las células T de ratón transducidas con el scFv-CD28- ζ se evaluó en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr durante 6 h. Las células T no fraccionadas transducidas (triángulos vacíos) y CD8⁺ (círculos vacíos) presentaban una lisis mayor de las células diana MDA-MB-435-erbB2 que las células T transducidas CD4⁺ (círculos rellenos) (F). No se observaba lisis en las células diana parentales MDA-MB-435 por las células T transducidas con el receptor quimérico (G) y las células T no fraccionadas transducidas falsamente (cuadrados rellenos), las células T CD8⁺ (triángulos rellenos) o las células T CD4⁺ (cuadrados vacíos) no lisaban ninguna línea celular. La lisis espontánea era < 10 % en todos los ensayos. Los resultados se expresan como la liberación de ⁵¹Cr específica \pm SE (%) de muestras por triplicado representativas de al menos dos experimentos.

La **FIG. 3** muestra que el aumento de la transferencia de células T CD4⁺ modificadas aumenta la supervivencia libre de tumores en los ratones. (A) Se inyectaron grupos de 10 ratones scid i.v. con 5×10^6 de células MDA-MB-435-erbB2 el día 0 antes de la inyección i.v. de células T transducidas con scFv-CD28- ζ el día 5. Los ratones se trataron con una relación 1:1 de células T transducidas CD4⁺ (5×10^6) y CD8⁺ (5×10^6) (cuadrados rellenos) presentaban un 100 % de supervivencia en comparación con el 30 % de supervivencia de los ratones que recibieron las células T transducidas no fraccionadas (cuadrados vacíos) (* $p < 0,005$, ensayo de Mann-Whitney). No se observó supervivencia de los ratones que recibieron las células T transducidas CD4⁺ solas (círculos rellenos), las células T transducidas CD8⁺ (círculos vacíos), células T transducidas de control (triángulos vacíos) o sin células T (triángulos rellenos) (B). El aumento de la supervivencia de los ratones era debido al aumento de transferencia de células T CD4⁺ específicas de antígeno. Todos los ratones scid que tenían un tumor MDA-MB-435-erbB2 que recibieron una relación 1:1 de células T transducidas CD8⁺ (5×10^6) y CD4⁺ (5×10^6) (cuadrados llenos) sobrevivieron en comparación con los ratones que recibieron una combinación 1:1 de células T CD8⁺ transducidas (5×10^6) y células T CD4⁺ intactas (5×10^6) (cuadrados vacíos), una combinación 1:1 de células T CD8⁺ transducidas (5×10^6) y células T CD4⁺ (5×10^6) transducidas con un receptor scFv-anti-CEA- γ irrelevante (triángulos vacíos) o tratamiento sin células T (triángulos llenos) (* $p < 0,0001$, ensayo de Mann-Whitney) (C). Para determinar la relación óptima de las células T CD4⁺ y CD8⁺ transducidas necesaria para conseguir el 100 % de supervivencia de los ratones que tienen metástasis de pulmón de MDA-MB-435-erbB2 establecidas 5 días, se trataron los ratones con células T CD8⁺ y CD4⁺ con las siguientes relaciones 1:1 (5×10^6 células T CD8⁺, 5×10^6 CD4⁺) (cuadrados vacíos), 9:1 (9×10^6 células T CD8⁺, 1×10^6 CD4⁺) (triángulos llenos), 3:1 ($7,5 \times 10^6$ células T CD8⁺, $2,5 \times 10^6$ CD4⁺) (triángulos vacíos), 1:3 ($2,5 \times 10^6$ células T CD8⁺, $7,5 \times 10^6$ CD4⁺) (círculos llenos) o 1:9 (1×10^6 células T CD8⁺, 9×10^6 CD4⁺) (círculos vacíos). Los ratones se trataron con células T CD4⁺ y CD8⁺ transducidas en falso a una relación de 1:1 (cuadrados llenos) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,0005$, ensayo de Mann-Whitney) (D) El aumento de la transferencia de células T CD4⁺ modificadas aumentaba la supervivencia de los ratones que tenían un tumor MDA-MB-435-erbB2 de 10 días. Los ratones scid que recibieron dos inyecciones i.v. de células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas el día 10 (5×10^6 células T CD8⁺, 5×10^6 CD4⁺) y el día 12 ($2,5 \times 10^6$ células T CD8⁺, $2,5 \times 10^6$ CD4⁺) (cuadrados llenos) o células T no fraccionadas transducidas el día 10 (10^7) y el día 12 (5×10^6) (cuadrados vacíos). Los ratones de control recibieron una transferencia 1:1 de células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas (triángulos llenos). Todos los resultados se calcularon como el porcentaje de cada grupo de supervivencia y son representativos de dos experimentos que se llevaron a cabo. Las flechas representan los días de transferencia de células T.

La **FIG. 4** muestra la liberación específica de antígeno de IFN- γ por las células T CD8⁺ transducidas es crítica para aumentar la supervivencia de los ratones. Se inyectaron los ratones scid i.v. con 5×10^6 células tumorales MDA-MB-435-erbB2 seguido por la transferencia combinada de células T del donante CD8⁺ (5×10^6) y CD4⁺ (5×10^6) el día 5 a partir de ratones BALB/c del tipo silvestre o BALB/c IFN- $\gamma^{-/-}$. Los ratones recibieron una transferencia 1:1 de células T CD8⁺IFN- $\gamma^{+/+}$:CD4⁺IFN- $\gamma^{+/+}$ (cuadrados llenos), células T CD8⁺IFN- $\gamma^{-/-}$:CD4⁺IFN- $\gamma^{-/-}$ (triángulos llenos), células T CD8⁺IFN- $\gamma^{-/-}$:CD4⁺IFN- $\gamma^{+/+}$ (círculos vacíos) o células T CD8⁺IFN- $\gamma^{+/+}$:CD4⁺IFN- $\gamma^{-/-}$ (triángulos vacíos) transducidas con scFv-CD28- ζ . Los ratones de control recibieron una transferencia 1:1 de células T CD8⁺ y CD4⁺ de tipo silvestre transducidas con el receptor scFv-anti-CEA- γ (cuadrados vacíos). Los resultados se calcularon como el porcentaje de cada grupo de supervivencia y son representativos de 2

experimentos. Las flechas representan el día de transferencia de células T (* $p < 0,05$, ensayo de Mann-Whitney).

La **FIG. 5** muestra la detección de las células T CD8⁺ y CD4⁺. Se inyectaron los ratones scid i.v. con células tumorales MDA-MB-435-erbB2 (5 x 10⁶ células) el día 0 seguido por una inyección i.v. de células T transducidas el día 5. Se recolectaron los pulmones y se prepararon para el análisis inmunohistológico 16 días después de la inoculación del tumor. Las secciones pulmonares de los ratones que habían recibido 1:1 células T CD4⁺ (5 x 10⁶) y CD8⁺ (5 x 10⁶) transducidas con scFv-CD28- ζ (A, E e I), células T transducidas no fraccionadas (10⁷), ratón n.º 1 (B, C y F), ratón n.º 2 (G, J y K), o 1:1 células T CD4⁺ (5 x 10⁶) y CD8⁺ (5 x 10⁶) transducidas con scFv- α -CEA- γ (D, H y L) se tiñeron con H/E, con los anticuerpos anti-CD4 (verde), anti-CD8 (rojo) y anti-CD11b (azul) (E-H) o con mAb anti-marcador (rojo) y anti-CD11b (verde) (I-L). Se muestran los campos representativos de múltiples secciones. Magnificación, x400. (M) Se recolectaron la sangre periférica y el bazo de los ratones el día 100 y se utilizaron para la detección de ARNm de neomicina fosfotransferasa (~400 pb). Tanto la sangre periférica (calles 4 y 5) como los bazos (calles 7 y 8) de dos ratones representativos tratados con células T CD4⁺ y CD8⁺ transducidas con scFv-CD28- ζ presentaban la presencia del gen de neomicina fosfotransferasa. No se detectaba neomicina fosfotransferasa en la sangre periférica (calle 3) o bazos (calle 6) de los ratones scid de control normales. Como controles, se detectó la β -actina en todas las muestras de sangre periférica (calle 3) y bazo (calle 8) ensayadas. No se detectó neomicina fosfotransferasa o β -actina en los controles vacíos de ADN (calle 2). Calle 1 = 1 kb más marcadores.

La **FIG. 6** muestra que la supervivencia de ratones a largo plazo puede inducir una respuesta secundaria específica de antígeno contra un nuevo desafío con el tumor. (A) Los ratones con supervivencia a largo plazo (100 días tras la inoculación primaria del tumor MDA-MB-435-erbB2) tratados con una transferencia combinada de células T transducidas CD4⁺ y CD8⁺ eran capaces de rechazar una segunda inyección i.v de células tumorales MDA-MB-435-erbB2 (5 x 10⁶ células) (cuadrados vacíos). Los ratones normales no rechazaban la inyección i.v de las células tumorales MDA-MB-435-erbB2 (5 x 10⁶) (cuadrados llenos) (* $p < 0,0001$, ensayo de Mann-Whitney). (B) A modo de ensayo adicional, se inyectó por vía subcutánea a los ratones de supervivencia a largo plazo 5 x 10⁴ células 4T1.2-erbB2 de carcinoma mamario de ratón (cuadrados llenos) o células parentales 4T1.2 (cuadrados vacíos) y se comparó estadísticamente su crecimiento (* $p < 0,005$, ensayo de Mann-Whitney). Como control, los ratones scid normales recibieron 5 x 10⁴ células 4T1.2-erbB2 (triángulos llenos) o células tumorales parentales 4T1.2 (triángulos vacíos) (C) Se comparó la supervivencia de los ratones de supervivencia a largo plazo que se inyectaron por vía subcutánea con 5 x 10⁴ células de 4T1.2-erbB2 (triángulos llenos) o parentales 4T1.2 (triángulos vacíos) (* $p < 0,005$, ensayo de Mann-Whitney). Como controles, se desafiaron ratones scid normales con 5 x 10⁴ células de 4T1.2-erbB2 (triángulos cerrados) (D). Para ensayar la capacidad de los ratones para erradicar una dosis menor del tumor 4T1.2-erbB2, se desafiaron los ratones de supervivencia a largo plazo por vía subcutánea con 5 x 10⁴ células (triángulos vacíos) o 5 x 10³ células tumorales 4T1.2-erbB2 (cuadrados vacíos) y se comparó estadísticamente la supervivencia (* $p < 0,001$, ensayo de Mann-Whitney). Como controles, se llevó a cabo el cultivo de las células tumorales 4T1.2-erbB2 en ratones SCID normales a 5 x 10⁴ células (triángulos llenos) o 5 x 10³ células (cuadrados llenos). Todos los resultados se calcularon como el porcentaje de cada grupo de supervivencia o se representaron como el tamaño medio (mm²) \pm SEM y son representativos de 2 experimentos.

La **FIG. 7** muestra una representación esquemática del receptor scFv-CD28- ζ . La construcción consiste en las regiones V_H y V_L extracelulares (EC) del anticuerpo scFv unidas mediante un enlazador flexible, una región de bisagra CD8 α proximal de membrana y las regiones transmembrana (TM) y citoplásmica (CYT) de la cadena de señalización CD28 fusionada al dominio intracelular de la cadena ζ del receptor de célula T. Se incorpora un epítipo marcador c-myc en el extremo C de la región V_L para el análisis de expresión.

La **FIG. 8** muestra un diagrama de flujo que describe la generación de las células T CD8⁺ y CD4⁺ modificadas genéticamente y su caracterización funcional *in vitro* e *in vivo*.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto la presente divulgación proporciona un método para la producción de una respuesta inmunitaria adoptiva contra una célula diana en un sujeto, incluyendo dicho método las etapas de modificación de una célula T CD4⁺ y modificación de una célula T CD8⁺ para que expresen una molécula capaz de unirse a un antígeno sobre la célula diana, y la administración de un número eficaz de células T CD4⁺ y CD8⁺ modificadas al sujeto.

Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que, en los experimentos de transferencia adoptiva *in vivo*, la administración de un número suficiente de antígeno CD4⁺ modificado en combinación con células CD8⁺ da lugar a un aumento significativo de la respuesta inmunitaria contra una célula diana. Se ha demostrado en el presente documento que la inyección de células T CD4⁺ y CD8⁺ modificadas para que expresen una molécula capaz de unirse a un antígeno asociado con un tumor da lugar a una mejora significativa de la supervivencia de sujetos que tienen metástasis pulmonares establecidas, en comparación con la transferencia de células T modificadas (sobre todo CD8⁺) derivadas del bazo sin fraccionar. De manera importante, las respuestas antitumorales en los sujetos se correlacionan con la persistencia y localización de las células T modificadas en el sitio del tumor y en la sangre y el

bazo. Los solicitantes han demostrado adicionalmente en el presente documento que los sujetos tratados con células T CD4⁺ y CD8⁺ modificadas que sobreviven a un desafío tumoral primario podrían rechazar un nuevo desafío posterior con el mismo tumor. Los estudios desvelados en el presente documento demuestran que la ventaja terapéutica de la transferencia combinada de células T CD4⁺ y CD8⁺ modificadas genéticamente específicas de antígeno aumentan significativamente las estrategias adoptivas de células T para el tratamiento de afecciones tales como el cáncer y las enfermedades infecciosas.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria adoptiva" se pretende que incluya cualquier respuesta inmunitaria desencadenada en un animal como resultado de la introducción o reintroducción en el animal de una célula del sistema inmunitario que se ha modificado *ex vivo* (es decir, fuera del animal) de cualquier manera que aumente la participación en una actividad inmunitaria del animal.

En una realización preferida del método, la respuesta inmunitaria adoptiva implica la interacción de las células T modificadas con la célula diana en un entorno completamente *in vivo*. Los solicitantes demuestran en el presente documento por primera vez la transferencia adoptiva de células T CD4⁺ y células CD8⁺ modificadas directamente en un sujeto, el desplazamiento de las células T a la célula diana, interactuando las tres células para dar lugar a una respuesta inmunitaria adoptiva. Por el contrario, los métodos descritos en la técnica anterior necesitan que las células T modificadas y la célula diana interactúen en un entorno *in vitro* antes de su administración al sujeto. Los métodos descritos en la técnica anterior no son aplicables clínicamente y solo sirven para demostrar el principio básico de la transferencia celular adoptiva.

Además, en la generación de una respuesta inmunitaria adoptiva mejorada, los solicitantes han demostrado que el aumento de la proporción de células T CD4⁺ modificadas podrían erradicar más eficazmente la enfermedad. Se utilizó el sistema de transducción retroviral para la expresión del receptor scFv-CD28- ζ para crear una célula T reactiva modificada contra el antígeno tumoral erbB2, sobre la superficie de las células T esplénicas CD8⁺ y CD4⁺ del ratón. Sorprendentemente, el aumento del número de células CD4⁺ por encima de que se produce normalmente cuando se utiliza una preparación esplénica de células T no fraccionadas daba lugar a la completa erradicación de tumores establecidos en los ratones, mientras que la transferencia de las células T principalmente CD8⁺ (es decir, con un número bajo de células CD4⁺) era significativamente menos eficaz.

Los solicitantes proponen varios mecanismos posibles para tener en cuenta en los resultados obtenidos, y puede ser que esté implicada una combinación de estos mecanismos o incluso otros mecanismos. Se debería entender que estas teorías propuestas no limitan la generalidad de la invención como se describe en el presente documento. En total, se postula que las células CD4⁺ y CD8⁺ modificadas viajan hasta el sitio del tumor o la infección e interactúan entre ellas, y la célula diana, para proporcionar condiciones que aumentan la actividad citotóxica en el entorno local de la célula diana.

Parece que el aumento de eficacia era dependiente al menos en parte de la especificidad antigénica de las células T CD4⁺ y se correlaciona con la localización del tumor y la persistencia a largo plazo de ambas células T CD8⁺ y CD4⁺. De manera importante, los ratones "curados" de primer tumor podrían posteriormente rechazar un segundo desafío con el tumor erbB2⁺. Este es el primer estudio que (i) demuestra definitivamente un papel *in vivo* de las células T CD4⁺ específicas de antígeno modificadas para aumentar la respuesta antitumoral (ii) demuestra la persistencia a largo plazo de células T modificadas transferidas de manera adoptiva y (iii) demuestra una potente respuesta secundaria específica del antígeno mediante células T modificadas genéticamente a continuación de un nuevo desafío con el tumor.

Más específicamente, la provisión de un número eficaz de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de antígeno puede facilitar la función de las T "auxiliares". De manera interesante, las células T CD8⁺ transducidas con scFv podrían mediar específicamente en altos niveles de citotoxicidad y la liberación del IFN- γ *in vitro*, pero no la secreción de IL-2 después de la unión con el antígeno. Por el contrario, las células T CD4⁺ transducidas con scFv presentaban una citotoxicidad reducida pero altos niveles de la secreción tanto de IFN- γ como de IL-2. Los solicitantes fueron capaces de demostrar *in vivo* utilizando células T de donantes de ratones IFN- γ ^{-/-} que el IFN- γ liberado por las células T CD4⁺ modificadas podía contribuir al efecto antitumoral en ausencia de IFN- γ de las células T CD8⁺. No obstante, dado el hecho de que se había demostrado previamente que la IL-2 era importante para el mantenimiento de la función de la célula T CD8⁺ *in vivo* (Theze et al, 2004; Taniguchi y Minami 1993), sigue siendo posible que la provisión 'ayuda' de IL-2 de las células T CD4⁺ transducidas también puede tener un papel en la mejora de la eficacia antitumoral observada después de la transferencia combinada de ambas células T modificadas CD8⁺ y CD4⁺.

En consecuencia, en una forma preferida del método, la respuesta inmunitaria adoptiva implica la ayuda de la célula T CD4⁺. El asunto de que si la adición de una célula T CD4⁺ de ayuda modificada (es decir, la liberación de IL-2) puede aumentar la inmunidad antitumoral, la persistencia a largo plazo y el rechazo del tumor secundario no se había considerado nunca como una cuestión relevante para la transferencia adoptiva de células T *in vivo*. Un problema principal es que las citocinas tales como la IL-2 son tóxicas cuando se administran sistémicamente a las dosis clínicamente eficaces. La estrategia de los solicitantes obvia la necesidad de administrar citocinas exógenas para aumentar la respuesta inmunitaria contra una célula diana, dada la manera muy precisa en la que la IL-2 se dirige aparentemente hacia el sitio del tumor o la infección. Dado que la técnica proporciona varios métodos para la

transducción eficaz de células T humanas tanto CD8⁺ como CD4⁺ (Hombach et al, 2001b; Teng et al, 2004; Finney et al, 2004; Hombach et al, 2001a), la inmunoterapia adoptiva utilizando células T ahora es clínicamente factible. Los estudios descritos en el presente documento demuestran la importancia de la ayuda de las células T CD4⁺ modificadas que representan un paso significativo para aumentar la terapia de células T citotóxicas redirigida para el tratamiento del cáncer y las enfermedades infecciosas.

Otra teoría es que la respuesta inmunitaria adoptiva proporcionada utilizando las células T CD4⁺ y CD8⁺ modificadas puede basarse al menos hasta cierto punto en la liberación de IFN- γ por las células CD8⁺. En consecuencia, en una forma preferida del método, la respuesta inmunitaria adoptiva implica la liberación de IFN- γ por las células T CD8⁺ modificadas. Para demostrar la importancia de la liberación de IFN- γ específico de antígeno secretado por las células CD8⁺, los solicitantes transdujeron y transfirieron de manera adoptiva combinaciones diferentes de células T CD8⁺ y CD4⁺ de donantes de ratones BALB/c de tipo silvestre y knockout a IFN- γ . Los 5 ratones que tenían el tumor sobrevivieron después de un tratamiento con una transferencia 1:1 de células T transducidas CD8⁺ y CD4⁺ con IFN- γ de tipo silvestre (Fig. 4). También se descubrió que este era el caso con ratones tratados con una transferencia 1:1 de células T transducidas CD8⁺IFN- $\gamma^{+/+}$ y CD4⁺IFN- $\gamma^{-/-}$ que sugieren que el IFN- γ producido por las células T CD4⁺ modificadas no era crítico para este efecto antitumoral. Por el contrario, solamente el 50 % de los ratones tratados con las células T transducidas CD8⁺IFN- $\gamma^{-/-}$ y CD4⁺IFN- $\gamma^{+/+}$ sobrevivían indicando que el IFN- γ secretado por las células T CD8⁺ modificadas era absolutamente esencial para conseguir un 100 % de supervivencia de los ratones (Fig. 4). No obstante, el IFN- γ producido por las células T CD4⁺ específicas de antígeno modificadas era capaz de compensarse parcialmente debido al hecho de que la transferencia de células T CD8⁺IFN- $\gamma^{-/-}$ y CD4⁺IFN- $\gamma^{-/-}$ modificadas no tenía efecto. Como control adicional, los ratones tratados con células T IFN- $\gamma^{+/+}$ CD4⁺ y CD8⁺ transducidas con un receptor irrelevante era incapaz de erradicar el tumor (Fig. 4).

Preferentemente, el número eficaz de células CD4⁺ modificadas será mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, y aproximadamente 9×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} células CD4⁺.

Preferentemente, el número eficaz de células CD8⁺ modificadas será mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, y aproximadamente 9×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} células CD8⁺.

En una realización altamente preferida del método, el número eficaz de células CD4⁺ modificadas es aproximadamente de 5×10^6 y el número eficaz de células CD8⁺ modificadas es aproximadamente de 5×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} de cada una de las células CD4⁺ y CD8⁺.

Se apreciará que el número de células CD4⁺ y CD8⁺ administradas puede necesitar que se optimice dependiendo del sujeto que se va a tratar. Una vez que el experto se sirve del hallazgo proporcionado por los solicitantes de que se debe utilizar un número eficaz de células CD4⁺ modificadas para el traslado eficaz de inmunoterapia adoptiva *in vivo*, se podría utilizar un procedimiento de experimentación de rutina para identificar un número eficaz. Por ejemplo, un animal tal como un ratón puede necesitar menos células que un animal mayor tal como un ser humano. Sin el deseo de colocar cualquier limitación indebida sobre la presente invención, el experto podría extrapolar el número eficaz encontrado para un ratón para estimar el número eficaz para un humano adulto. Por ejemplo, si un ratón de 20 g necesita la administración de 5×10^6 células, luego un adulto humano que pese 80 kg puede necesitar $5 \times 10^6 \times (80000/20) = 2 \times 10^{10}$ células. En una forma preferida del método, cuando el sujeto es un ser humano adulto, se utilizan entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} de cada una de las células CD4⁺ y CD8⁺.

Aunque los solicitantes han identificado números eficaces de células CD4⁺, también se considera que la relación de células modificadas CD4⁺ respecto a CD8⁺ puede ser importante. Para determinar la relación óptima de células T CD4⁺ y CD8⁺ transducidas con scFv-CD28- ζ necesarias para conseguir un 100 % de supervivencia, los ratones que tenían un tumor de MDA-MB-435-erbB2 de 5 días se trataron con diferentes relaciones de células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas con scFv-CD28- ζ . De manera interesante, solo una relación 1:1 de células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas (5×10^6 de cada subconjunto de células T) daba como resultado un 100 % de supervivencia consistente con los experimentos previos (Fig. 3 C). Por el contrario, el porcentaje de supervivientes disminuía significativamente cuando los ratones recibían una mayor proporción de células T transducidas CD8⁺ o CD4⁺ (Fig. 3 C). En consecuencia, en un método preferido, la relación de células CD4⁺ respecto a células CD8⁺ administradas al sujeto es mayor de aproximadamente 1:9 y menor de aproximadamente 9:1. Más preferentemente, la relación es mayor de aproximadamente 1: 3 y menor de aproximadamente 3:1. En una realización altamente preferida del método la relación es aproximadamente de 1:1. Como se apreciará, una vez que el experto hace uso de la información de que la relación de las células T CD4⁺ modificadas respecto a las células T CD8⁺ modificadas puede ser importante para la eficacia del método, sería de rutina investigar la relación óptima para cualquier especie, subespecie, o individuo.

La capacidad para transferir de manera adoptiva las células T CD8⁺ y CD4⁺ modificadas para controlar tumores más

avanzados también se ensayó. Los ratones que tenían un tumor MDA-MB-453-erbB2 de 10 días que recibieron dos inyecciones i.v de células T transducidas CD4⁺ y CD8⁺ con una relación de 1:1 (7,5 x 10⁶ células totales de cada subconjunto) presentaba un 70 % de tasa de supervivencia (Fig. 3 D). Por el contrario, solo sobrevivió el 20 % de los ratones tratados con células T transducidas no fraccionadas (Fig. 3 D). Colectivamente, estos resultados demostraban por primera vez *in vivo* que la transferencia óptima de células T CD4⁺ modificadas específicas de antígeno podían mejorar significativamente la terapia con células T redirigidas para el tratamiento del cáncer.

El experto en la técnica estará familiarizado con un número de fuentes para células T útiles en el contexto de la presente invención. Se pueden utilizar los tejidos implicados en las respuestas inmunitarias específicas tales como bazo, timo, ganglios linfáticos, médula ósea, o sangre. De manera alternativa, se podría utilizar tejido tumoral o infectado ya que estos tejidos contendrán células CD4⁺ y CD8⁺ útiles en el contexto de la presente invención. Para la terapia humana se contempla que la sangre o el tumor son la fuente más apropiada.

Cuando la fuente de células T es el bazo, la relación entre células CD4⁺ respecto a células CD8⁺ necesitará normalmente ajustarse para proporcionar un número eficaz de células T CD4⁺. En general, una población de células T no fraccionadas derivadas del bazo consistirá en un 80 a 85 % de células CD8⁺ y aproximadamente un 10 a 15 % de células CD4⁺. En consecuencia, puede ser necesario aumentar el nivel de células CD4⁺ en comparación con las células CD8⁺. El experto en la técnica estará familiarizado con uno o varios métodos adecuados para alterar el número de células CD4⁺ en una población celular. Se contemplan como útiles metodologías tales como clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), perlas magnéticas revestidas con anticuerpo específico de CD4⁺, "paning" por anticuerpo, privación por anticuerpo monoclonal y complemento.

Preferentemente, la molécula capaz de unirse al antígeno incluye un receptor para el antígeno, o una parte de un receptor o un equivalente funcional de un receptor. El receptor podría ser una proteína o glicoproteína que tienen la estructura primaria y/o secundaria y/o terciaria necesarias que proporcione una superficie estérica y/o cargada electrostáticamente adecuadas por la que se pueda unir el antígeno. El receptor puede basarse en un receptor que sea conocido por unirse con el antígeno en la naturaleza (o ejemplo, una región variable de un anticuerpo), o de manera alternativa se puede diseñar *de novo* basándose en el conocimiento de la forma y/o la carga del antígeno. Otra posibilidad es que el receptor se base en una molécula identificada mediante exploración aleatoria entre un gran número de moléculas candidatas.

En una forma preferida de la invención, la célula se modifica para que exprese una molécula de receptor quimérico que incorpore un dominio de anticuerpo de cadena sencilla extracelular (scFv) y un dominio de señalización transmembrana y citoplásmico que pueda dirigir específicamente las respuestas inmunitarias antitumorales de una manera independiente del MHC a dianas que normalmente son capaces de evadirse del reconocimiento inmunitario. Estas dianas también carecen a menudo de ligandos co-estimulantes para maximizar la activación de células T. El potencial terapéutico de las células T modificadas se extiende de los estudios que demuestran una unión específica al antígeno y la lisis de la célula diana en un intervalo de diferentes modelos tumorales en el ratón (Haynes et al, 2001a; Haynes et al, 2001b; Kershaw et al, 2004; Darcy et al, 2000; Hwu et al, 1995) a su transferencia satisfactoria en los pacientes con mínimos efectos secundarios en ensayos clínicos en Fase I (Mitsuyasu et al, 2000).

Varios estudios recientes han demostrado que cuanto más potente es el receptor scFv para la activación máxima de las células T primarias tanto de ratón como de seres humanos era la incorporación de una quimera de los motivos de señalización del CD28 co-estimulante y el CD3 ζ unidos en tándem en el dominio intracelular (scFv-CD28-ζ) (Haynes et al, 2002a; Haynes et al, 2002b; Finney et al, 1998; Hombach et al, 2001b). Estos estudios demostraron que las células T modificadas con este nuevo receptor podía secretar citocinas más eficazmente y proliferar después de la unión en comparación con una quimera que contenía el dominio de señalización ζ solo (scFv-ζ) (Haynes et al, 2002a; Haynes et al, 2002b). Además, los estudios en el laboratorio de los solicitantes se ha demostrado que las células T primarias de ratón que expresan la quimera scFv-CD28-ζ podía erradicar más eficazmente la enfermedad subcutánea establecida y metastásica en varios modelos de tumores en animales (Kershaw et al, 2004). Mediante estudios mutacionales del dominio de señalización citoplásmico CD28, se descubrió que el aumento de la función efectora de la célula T proporcionada por el receptor scFv-CD28-ζ era totalmente dependiente del componente co-estimulante CD28 (Moeller et al, 2004). De manera interesante, las células T transferidas adoptivamente que se utilizan en estos experimentos comprendían constantemente principalmente células T CD8⁺ y normalmente solo un pequeño número de células T CD4⁺ (~10 %).

Preferentemente, la molécula capaz de unirse al antígeno incluye secuencias del TCR-ζ y/o dominios de señalización co-estimulantes de CD28, o equivalentes funcionales de los mismos. Las estrategias de inmunoterapia adoptiva que implican la modificación génica de células T autólogas con receptores quiméricos de scFv o genes de TCR está ganando una aceptación más amplia como tratamiento prometedor para el cáncer. Además, los avances recientes en el diseño de receptores scFv que comprenden tanto los dominios de señalización primario TCR-ζ y CD28 co-estimulante han demostrado resultados sorprendentes contra el crecimiento tumoral subcutáneo precoz y las metástasis tumorales en ratones después de la transferencia adoptiva (Haynes et al, 2002a; Haynes et al, 2002b).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "equivalente funcional" pretende significar cualquier

secuencia de aminoácidos que tenga la misma función - o biológicamente similar - que los dominios de señalización TCR- ζ y CD28 co-estimulante descritos expresamente en el presente documento. El experto en la técnica entenderá que se pueden hacer distintas sustituciones, inserciones, eliminaciones y truncados en una secuencia de aminoácidos mientras siga manteniendo al menos una parte de la actividad biológica de la proteína original.

5 Además, el uso de aminoácidos distintos de los aminoácidos se puede utilizar en el contexto de la presente invención. Dadas las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, será posible para el experto en la técnica manipular las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento y ensayar si es eficaz la respuesta inmunoterápica adoptiva. En algunos casos, la respuesta será la misma o similar, en otros casos, la respuesta será menos eficaz, y en otros casos la respuesta será más eficaz.

10 Una realización descrita en el presente documento utiliza células T modificadas con scFv que incorporan una actividad "co-estimulante" incorporada, siendo capaces de reconocer dianas tumorales de una manera no restringida al MHC afrontando claramente los problemas asociados con la regulación negativa de la clase I del MHC y la falta de expresión de ligandos co-estimulantes críticos por las células tumorales. Además de esto, estos estudios revelaron que la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ o CD4⁺ transducidas con scFv-CD28- ζ solas no tenían efecto antitumoral lo que era consistente con una falta de persistencia de estas modificadas genéticas en el sitio tumoral. En una forma altamente preferida de la invención, la célula T se transduce con una construcción como se muestra en la Fig. 7.

20 Preferentemente, la población de células T se obtiene del sujeto, sin embargo, se contempla que las células se podrían obtener de un gemelo u otro miembro de la familia, o de un donante no relacionado con compatibilidad tisular apropiada. También puede ser posible utilizar una línea celular continua.

25 El experto entenderá que la presente invención es esencialmente genérica y será útil para el direccionamiento de una respuesta inmunitaria mediada por una célula contra un amplio intervalo de antígenos tales como los que se encuentran en o sobre las células tumorales, o los antígenos que se encuentran en o sobre las células infectadas con un virus (por ejemplo, un VIH), una micobacteria (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*) o un parásito (por ejemplo, *Plasmodium falciparum*). Sin embargo, en una realización preferida del método, el antígeno es un antígeno asociado con una célula cancerosa. Preferentemente el antígeno es una proteína oncogénica mutante o una proteína de superficie celular asociada a un tumor. Preferentemente el antígeno se selecciona de entre el grupo que consiste en Le^y, EGFR, PMSA, G250, NY-ESO1, CD20, CD19, idiotipo de Ig, p53, ras, CEA, MUC1, GD2, y HuD. En una forma altamente preferida del método el antígeno es Le^y o erbB2.

35 El presente método necesita que las células T se modifiquen para que expresen una molécula capaz de unirse al antígeno. Como se utiliza en el presente documento, el término "modificación" pretende incluir cualquier procedimiento por el cual una célula T pueda alterarse genéticamente de manera que se produzca una molécula capaz de unirse a un antígeno de interés. El experto está familiarizado con un intervalo de métodos capaces de alterar genéticamente células de mamífero, incluyendo el uso de bombardeo de partículas, electroporación, y vectores retrovíricos. Sin embargo, un asunto importante en la aplicación de la terapia génica en la clínica que implica la transferencia génica retroviral es el potencial riesgo de oncogénesis insercional. El riesgo se resaltó recientemente cuando dos de los diez pacientes SCID-X1 transfundidos con la médula ósea autóloga modificada genéticamente derivada de células madre y progenitoras desarrollaron leucemia de células T (Hacein-Bey-Abina et al, 2003). Sin embargo, en el caso de las estrategias de inmunoterapia adoptiva de células T no se ha informado de transformación de células T en modelos animales ni en pacientes (Haynes et al, 2002a; Haynes et al, 2002b; Mitsuyasu et al 2000; Yee et al, 2002; Rosenberg et al, 1986). En consonancia con esto, no se observaron signos de transformación en los ratones de supervivencia a largo plazo de los solicitantes incluso después del nuevo desafío con el tumor a pesar del hecho de que la persistencia de las células modificadas genéticamente se podía detectar tanto en bazo como en sangre periférica. En cualquier caso, si apareciera un problema con la transferencia de células T modificadas genéticamente en pacientes, se podría emplear una estrategia de gen suicida que implique el 40 hsv-tk (Cohen et al, 1999) o el dominio citoplásmico de Fas (Thomis et al, 2001). De manera alternativa, el diseño de nuevos vectores de integración que se dirigen a sitios del genoma que se consideran "seguros" se podrían probar en ensayos futuros.

55 Preferentemente, la célula modificada persiste localmente en el sitio del tumor o la infección en el sujeto a largo plazo. En una forma del método, las células modificadas persisten en el sitio del tumor o la infección durante al menos 100 días. Esto se demostró por el hecho de que (a) las células T se encontraban en el sitio del tumor (estas células no eran endógenas ya que se utilizaron ratones scid, (b) las células T se identificaron por análisis de FACS como que se habían modificado. Las células persistentes también eran funcionales ya que se había demostrado que los sujetos permanecían libres de tumor durante 100 días (véase la Fig. 6A). Una de las características sorprendentes de este estudio era la capacidad de las células T CD8⁺ y CD4⁺ modificadas genéticamente para persistir a largo plazo y rechazar específicamente un nuevo desafío posterior con el tumor. Según los conocimientos del solicitante esto no se había publicado nunca anteriormente para las células T modificadas genéticamente transferidas adoptivamente y representa potencialmente un paso significativo para la aplicación de este tipo de 60 terapia en la clínica para el tratamiento no solo de pacientes con tumores primarios sino en casos de recaída tumoral donde los depósitos de cáncer han metastatizado a múltiples sitios.

En una forma preferida del método, la respuesta inmunitaria adoptiva da lugar a la erradicación completa de la infección o el tumor.

5 Aunque serán aceptables varias formas de administración de las células, una forma preferida del método proporciona que la administración se mediante inyección sistémica. La capacidad para administrar las células sistémicamente revela una ventaja adicional del presente método ya que los solicitantes han demostrado la capacidad de las células para viajar y depositarse en el sitio de la infección o el tumor u otra patología desde una localización remota. Existe una importante diferencia entre los métodos descritos en el presente documento y los de Gyobu et al 2004 que describían respuestas antitumorales después de la transferencia combinada de células diana 10 junto con células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas humanas. Por lo tanto, los efectos antitumorales en los ratones solamente se observaron por Gyobu et al., después de la preincubación de las células efectoras y diana antes de la inyección. Esto es muy diferente de los métodos que se describen en el presente documento en el que las células T modificadas se administran de manera sistémica, con el desplazamiento de las células al sitio tumoral. Por el contrario, los solicitantes han demostrado la erradicación completa de un tumor establecido en un sitio distante 15 después de la inyección sistémica de células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas de ratón. Además, los estudios demuestran la persistencia y función a largo plazo de estas células T modificadas genéticamente después de un nuevo desafío con el tumor.

20 Otra diferencia entre el trabajo de Gyobu et al., y los métodos desvelados en el presente documento es la incapacidad del IFN- γ humano liberado por las células T transducidas humanas para interactuar con los receptores IFN- γ endógenos del huésped. Además, se ha demostrado en este estudio utilizando células T de donante de ratones IFN- γ ^{-/-} un papel del IFN- γ secretado por las células T CD8⁺ modificadas del ratón en el rechazo antitumoral. Sin embargo, este brazo efector y los efectos posiblemente importantes de otras citocinas estaban ausentes en el estudio de Gyobu et al.

25 Preferentemente, la respuesta inmunitaria adoptiva es capaz de prevenir el establecimiento de un nuevo tumor o infección. Los experimentos que se describen en el presente documento demuestran por primera vez *in vivo* que la provisión de células T CD⁺ modificadas específicas de antígeno puede mejorar significativamente las respuestas antitumorales, mantener la persistencia de las células T transferidas e inducir una potente respuesta de reclutamiento después de un nuevo desafío con el tumor. Esto es un avance sustancial sobre los métodos de 30 inmunoterapia adoptiva de la técnica anterior.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para la inmunoterapia adoptiva que incluye una célula T CD4⁺ modificada y una célula T CD8⁺ modificada.

40 Preferentemente, el número eficaz de células CD4⁺ modificadas será mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, y aproximadamente 9×10^6 . Cuando la composición se va a utilizar con un sujeto humano adulto, se puede utilizar entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} células CD4⁺.

45 Preferentemente, el número eficaz de células CD8⁺ modificadas será mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, y aproximadamente 9×10^6 . Cuando la composición se va a utilizar con un sujeto humano adulto, se puede utilizar entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} células CD8⁺.

50 En una realización altamente preferida de la composición, el número eficaz de células CD4⁺ modificadas es aproximadamente de 5×10^6 y el número eficaz de células CD8⁺ modificadas es aproximadamente de 5×10^6 . Cuando la composición es para su uso con un sujeto humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} de cada una de las células CD4⁺ y CD8⁺.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para la inmunoterapia adoptiva que consiste en una célula T CD4⁺ modificada y una célula T CD8⁺ modificada. Preferentemente, el número eficaz de células CD4⁺ modificadas será mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, y aproximadamente 9×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} células CD4⁺. Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que no es necesario incluir una célula diana en la composición antes de la administración al sujeto. Esto es una ventaja considerable ya que no es necesario retirar del sujeto el tejido que contiene la célula diana. Por ejemplo, el clínico puede saber que el sujeto tiene un tumor en particular (por ejemplo, por la aparición de un antígeno asociado al tumor en el suero) pero no es necesario para la presente invención que se retire tejido tumoral del sujeto. En vez de eso, el clínico podría administrar células CD4⁺ y CD8⁺ capaces de unirse a ese tipo específico de tumor. 60

65 Preferentemente, el número eficaz de células CD8⁺ modificadas será mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, y aproximadamente 9×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} células CD8⁺.

En una realización altamente preferida del método, el número eficaz de células CD4+ modificadas es aproximadamente de 5×10^6 y el número eficaz de células CD8+ modificadas es aproximadamente de 5×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} de cada una de las células CD4+ y CD8+.

En un aspecto adicional más, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o prevención de un cáncer o una infección incluyendo dicho método la administración a un animal que lo necesite de una célula T CD4+ modificada y una célula T CD8+ modificada en el que la célula T CD4+ y la célula T CD8+ se modifican para que expresen una molécula capaz de unirse a un antígeno del cáncer o la infección. Se debería entender que el método es esencialmente de naturaleza genérica y se puede aplicar a muchas formas de cáncer o infección. El experto en la técnica entenderá que para atacar una célula diana en particular, sería necesario primero identificar un antígeno que se esencialmente único de esa célula, y normalmente no se encuentre en las células de tejidos sanos, o al menos no se encuentre en cantidades apreciables. Una vez que se identifica el antígeno, se identifica una molécula capaz de unirse al antígeno. Las células CD4+ y CD8+ se alteran entonces genéticamente para que expresen la molécula capaz de unirse al antígeno posiblemente con otros factores co-estimulantes como se ha descrito en el presente documento. Mediante experimentación de rutina, el experto podría entonces identificar el medio óptimo para la administración de las células al sujeto. Sin embargo, una ventaja particular del método es que las células modificadas persisten durante periodos extensos en el sitio de la infección o el tumor. En consecuencia, el método se utiliza preferentemente con respecto a cánceres particularmente refractarios tales como el cáncer de mama, cáncer de colon, o cáncer ovárico. Sin embargo, esto no limita la amplia aplicabilidad del método para tratar cualquier otro cáncer. Además, algunos antígenos asociados con tumores (tales como Le^y) se encuentran en un intervalo de diferentes cánceres, y, en consecuencia, se podría utilizar la presente invención para tratar dos o más tipos de cáncer en el mismo o diferentes pacientes. El cáncer puede estar presente como un tumor primario o una metástasis de un tumor primario.

En un aspecto adicional más, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o prevención de un cáncer o una infección, incluyendo dicho método la administración a un animal que lo necesite de una composición descrita en el presente documento.

En un aspecto adicional más, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento o prevención de un cáncer o una infección, incluyendo dicho método un método para la producción de una respuesta inmunitaria adoptiva como se describe en el presente documento o una composición como se describe en el presente documento. El método se puede utilizar con respecto a cualquier cáncer, sin embargo, los cánceres que incluyen células que presentan el marcador erbB2 están preferentemente implicados. En una realización del método, el tratamiento o prevención es para la recaída de un cáncer.

Los métodos de tratamiento o prevención se pueden utilizar en combinación con medios para la disminución de la inmunocompetencia del sujeto. Preferentemente, el medio es un medio no mieloablativo, por ejemplo, mediante la administración de ciclofosfamida. En el presente estudio se utilizaron ratones scid para los experimentos de transferencia celular debido a la naturaleza inmunogénica del antígeno diana erbB2 humano. Se debería esperar que las células T modificadas genéticamente puedan persistir e inducir potentes respuestas de reclutamiento en un huésped inmunocompetentes, tal como un paciente. Los experimentos descritos en el presente documento que utilizan el sistema scid son relevantes y se podrían imitar en pacientes mediante un régimen no mieloablativo que implique la administración de ciclofosfamida. Dichos regímenes se utilizan actualmente en pacientes que reciben células T específicas de melanoma que pueden aumentar el efecto terapéutico amortiguando el efecto inmunosupresor de las células T reguladoras (Dudley et al, 2002).

También se proporciona en la invención el uso de una composición como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer. En una forma de la invención, el cáncer incluye una célula que presenta el marcador erbB2.

Un aspecto adicional de la presente divulgación proporciona un método de suministro de una célula T CD4+ modificada y una célula T CD8+ modificada contra una célula diana de un sujeto, incluyendo dicho método las etapas de administración de la célula T CD4+ modificada y la célula T CD8+ modificada al sujeto en un sitio remoto para la célula diana, permitir que la célula T CD4+ modificada y la célula T CD8+ modificada circulen hasta la célula diana, y permitir que la célula T CD4+ modificada, la célula T CD8+ modificada y la célula diana interactúen para proporcionar una respuesta inmunitaria contra la célula diana.

En otro aspecto la presente invención proporciona un método de producción de una población celular para la inmunoterapia adoptiva contra un antígeno, incluyendo dicho método las etapas de proporcionar una población de células T CD4+ y CD8+ de un tejido inmunitario de un sujeto, aumentar el número de células CD4+, o aumentar la relación de células T CD4+ con respecto a las células T CD8+ en la población, y modificar las células T CD4+ y CD8+ para expresar una molécula capaz de unirse al antígeno.

Como se entenderá por un experto, las etapas de aumento de la relación y la modificación pueden tener lugar en

cualquier orden. Sin embargo, preferentemente la etapa de aumento del número precede el de la modificación de las células.

5 Preferentemente, el tejido inmunitario se selecciona de entre el grupo que consiste en el bazo, timo, ganglios linfáticos, médula ósea o se puede utilizar sangre. De manera alternativa, se podría utilizar tejido tumoral o infectado ya que estos tejidos contendrán células CD4+ y CD8+ útiles en el contexto de la presente invención. Para la terapia humana se contempla que la sangre o el tumor son la fuente más apropiada.

10 Preferentemente, el número eficaz de células CD4+ modificadas será mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, y aproximadamente 9×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} células CD4+.

15 Preferentemente, el número eficaz de células CD8+ modificadas será mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente $2,5 \times 10^6$, aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente $7,5 \times 10^6$, y aproximadamente 9×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} células CD8+.

20 En una realización altamente preferida del método, el número eficaz de células CD4+ modificadas es aproximadamente de 5×10^6 y el número eficaz de células CD8+ modificadas es aproximadamente de 5×10^6 . Cuando el sujeto es un ser humano adulto, se pueden utilizar entre aproximadamente 10^{10} y 10^{11} de cada una de las células CD4+ y CD8+.

25 La presente invención se describirá ahora más completamente en los siguientes Ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y métodos

30 Se implementaron los siguientes materiales y métodos para los experimentos descritos en los Ejemplos 2 a 6.

35 *Cultivo celular.* Las células de adenocarcinoma de colon B6 de ratón MC38, las células MC38-erbB2 que expresan erbB2, células de carcinoma mamario humano MDA-MB-435, células MDA-MB-435 que expresan erbB2, células de carcinoma mamario del ratón 4T1.2 y las células 4T1.2-erbB2 que expresan erbB2 se cultivaron en DMEM suplementado con un 10 % (v/v) de FCS, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Life Technologies, Grand Island, NY). Estas líneas celulares tumorales eran CD80⁻ y CD86⁻. Las células de empaquetamiento retroviral GP+E86 ecotrófico y las células de empaquetamiento PA317 anfotrófico se cultivaron en DMEM suplementado. Las células GP+E86 se cultivaron en DMEM que contenía 0,5 mg/ml de G418 (Life Technologies). Las células T esplénicas transducidas de manera retroviral se cultivaron en DMEM con 100 U/ml de rIL-2 humana (amablemente proporcionada por Chiron, Emeryville, CA).

45 *Ratones.* Los ratones BALB/c y BALB/c *scid/scid* (*scid*) se adquirieron en The Walter y Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australia. Los ratones BALB/c deficiente en IFN-γ (BALB/c IFN-γ^{-/-}) se criaron en el Peter MacCallum Cancer Centre, Melbourne. Se utilizaron ratones de 6 a 12 semanas de edad en los experimentos que se llevaron a cabo con las directrices del comité de ética en animales de experimentación.

50 *Generación de las células T de ratón CD4+ y CD8+ transducidas con el receptor scFv.* Se clonó una construcción génica quimérica compuesta por el anticuerpo monoclonal (mAb) scFv anti-erbB2, una región bisagra proximal a la membrana del CD8 humano, y las regiones transmembrana y citoplasmática de la cadena de señalización CD28 del ratón fusionadas con la región citoplasmática del TCR-ζ humano (scFv-anti-erbB2-CD28-ζ) en el vector retroviral pLXSN como se había descrito anteriormente (Haynes et al, 2002b). Se aisló una línea celular de empaquetamiento ecotrófico GP+E86 estable que expresa el receptor scFv-anti-erbB2-CD28-ζ como se había descrito anteriormente (Haynes et al, 2002b). La transducción de los linfocitos T esplénicos del ratón se llevó a cabo utilizando clones de GP+E86 que producen $\sim 10^7$ ufc/ml. En resumen, las células esplénicas del ratón BALB/c donante se privaron de glóbulos rojos sanguíneos (RBC) mediante lisis hipotónica con NH₄Cl y se pasaron a través de una jeringa de lana de nailon para el enriquecimiento como se había descrito anteriormente (Darcy et al, 2000; Haynes et al, 2001). Para generar las células T CD8⁺ y CD4⁺ cada subconjunto de células T se aisló inicialmente mediante marcado con perlas magnéticas anti-CD4 o anti-CD8 (Miltenyi Biotec) y se pasaron a través de una columna de privación MACS. La eficacia del aislamiento para separar los subconjuntos de células T se verificó mediante citometría de flujo. Los cultivos celulares enriquecidos de células T CD8⁺, CD4⁺ o no fraccionadas (10^7 células) se co-cultivaron inmediatamente con células de empaquetamiento productoras de retrovirus (5×10^5) durante 72 h en DMEM suplementado con 4 µg/ml de polibreno, 5 µg/ml de PHA (Sigma, St Louis, MO) y 100 U/ml de rIL-2. Después del cultivo, las células T se analizaron en cuanto a la eficacia de transducción por citometría de flujo.

65 *Citometría de flujo.* Se determinó la expresión del receptor quimérico α-erbB2-CD28-ζ en la superficie de las células T de ratón transducidas CD8⁺, CD4⁺ o no fraccionadas mediante inmunofluorescencia indirecta con un Ab marcador

c-myc, seguido por una tinción con un mAb anti-Ig de ratón marcado con PE (BD Biosciences, San Jose, CA). Se evaluó la fluorescencia de fondo utilizando el mAb anti-Ig de ratón marcado con PE. El fenotipado de superficie celular se determinó mediante tinción directa con mAb anti-CD4 marcado con FITC (RM4-5; PharMingen) y anti-CD8 marcado con PE (53-6.7; PharMingen) como se había descrito anteriormente. La población de células T no fraccionadas consistía en un 80-85 % de CD8⁺ y un 10-15 % CD4⁺ de células T como se había demostrado anteriormente (Haynes et al, 2002a; Haynes et al, 2002b; Darcy et al 2000; Haynes et al, 2001).

Citotoxicidad específica de antígeno, secreción de citocinas y proliferación por las células T transducidas. La capacidad de las células T transducidas para mediar específicamente la lisis de la célula diana se evaluó en un ensayo de liberación de cromo de 6 h, como se ha descrito anteriormente (Darcy et al 1998). La capacidad de las células T transducidas para producir citocinas después de la unión con el antígeno erbB2 se determinó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) (PharMingen). Las células T CD8⁺, CD4⁺ o no fraccionadas de ratón (10⁶) transducidas con el receptor scFv- α -erbB2-CD28- ζ o células T CD8⁺ y CD4⁺ falsas transducidas con un vector LXSN vacío se co-cultivaron con 10⁶ células tumorales erbB2⁺ MC-38-erbB2, MDA-MB-435-erbB2 o 4T1.2-erbB2 o células tumorales parentales erbB2- MC-38, MDA-MB-435 o 4T1.2 en placas de 12 pocillos durante 20 h. No se añadió IL-2 exógena. Los sobrenadantes se recolectaron y se determinó la producción de IFN- γ , IL-2, GM-CSF, y IL-4 por las células T transducidas mediante ELISA. La citocina liberada mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 endógenos se evaluó para cada población de célula T efectora utilizando el mAb CD3 unido a la placa (1 μ g/ml) (145.2C11; PharMingen) y CD28 (1 μ g/ml) (37.51; PharMingen). Se evaluó la capacidad proliferativa de las células T transducidas en un ensayo de incorporación de [³H]-timidina. Las células T de ratón modificadas (10⁵ células/ml) se cultivaron en placas de 96 pocillos con el fondo en U y se estimularon con un mAb anti-marcador o Mab CD3 más CD28 de control (1 μ g/ml) durante 3 días. Los cultivos se pulsaron entonces con 0,5 μ Ci/pocillo (0,0185 MBq) de [³H]-timidina (Amersham, Aylesbury, Reino Unido) durante las últimas 16 horas del periodo de cultivo y la incorporación de la radioactividad se midió en un Contador de Centelleo TRI-CARB 2100TR Liquid (Packard, Meriden, CT).

Inmunohistoquímica. Se llevó a cabo la tinción con hematoxilina/eosina, e inmunohistoquímica en las secciones congeladas. Los anticuerpos que se utilizaron fueron anti-CD4 de ratón con FITC, anti-CD8b.2 de ratón con biotina, anti-CD11b de ratón con APC, anti-CD11b de ratón con FITC (todos de Becton Dickinson), anti-marcador myc-biotina (Abcam), isotipos de control y un secundario 594 con Alexa® estreptavidina (Molecular Probes).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La detección de células T modificadas genéticamente después de la transferencia adoptiva en ratones se evaluó mediante amplificación por PCR del gen de la neomicina fosfotransferasa. Los ratones que tenían un tumor MDA-MB-435 de 5 días se inyectaron con células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas con scFv-CD28- ζ y se extrajo sangre de los ojos o se retiraron los bazos en distintos momentos. Se lisaron los glóbulos rojos sanguíneos utilizando un tampón de lisis ACK (a TA durante 5 min), se lavaron y se resuspendieron las células a 5 x 10⁶ células/200 μ l. El ADN genómico de la sangre periférica o esplenocitos se purificó posteriormente por PCR utilizando el MiniKit de ADN en sangre QIAamp® según las instrucciones del fabricante (QIAGEN, Clifton Hill, Australia). El cebador en sentido de neomicina era 5'-TGGCTGCTATTGGGCGAAGT-3'; el antisentido era 5'-TATCACGGGTAGCCAACGCT-3', el cebador en sentido de β -actina de ratón era 5'-AGGCGGTGCTGTCCTTGAT-3'; el antisentido era 5'-GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT-3'. Los cebadores directos e inversos para los genes tanto de neomicina como de β -actina se diseñaron para amplificar fragmentos de aproximadamente 400 pb utilizando la ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA, USA). Las condiciones de la amplificación por PCR de la neomicina y β -actina eran 30 ciclos, que consistían en desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 58 °C durante 30 s, y extensión a 68 °C durante 1,5 min. Los productos de la amplificación se cuantificaron utilizando 1 kb de marcadores Plus (Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA, USA) sobre un gel de agarosa al 1 % p/v y se visualizó con fluorescencia de bromuro de etidio.

Modelo de transferencia adoptiva. La actividad antitumoral de células T transducidas se evaluó contra la línea celular tumoral MDA-MB-435-erbB2 como se ha descrito previamente (Haynes et al, 2002b). En resumen, se inyectaron ratones scid i.v. con 5 x 10⁶ células de carcinoma de mama humano MDA-MB-435-erbB2 para establecer metástasis pulmonares. Las células T transducidas con scFv-CD28- ζ no fraccionadas (10⁷), las células T CD8⁺ o CD4⁺ solas transducidas (10⁷), o una combinación 1:1 de células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas (5 x 10⁶ de cada) de los ratones BALB/c donantes se inyectaron i. v. en grupos de 5-10 ratones los días 5 o 10 después de la inoculación del tumor. Para los experimentos de evaluación del número mínimo de CD4 modificadas necesarias para conseguir la regresión total del tumor, los ratones recibieron relaciones diferentes de células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas. La transferencia adoptiva de las células T transducidas con un receptor scFv irrelevante (scFv- α -CEA- γ) o transducidas falsamente con un vector pLXSN vacío servían como controles. Además, la transferencia adoptiva de los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ transducidos con scFv (5 x 10⁶ de cada, día 5) de BALB/c de tipo silvestre o ratones BALB/c IFN- γ ^{-/-} donantes se utilizaron para evaluar el papel del IFN- γ liberado por cualquier subconjunto de células T en el efecto antitumoral. Todos los ratones se controlaron diariamente en cuanto al crecimiento tumoral, indicado por la insuficiencia respiratoria y la pérdida de la condición corporal. El crecimiento tumoral se evaluó de la siguiente manera; (Haynes et al, 2002a) en los experimentos de supervivencia, los ratones que tenían morbilidades se sacrificaron y el día de la muerte se registró el peso de los pulmones (Haynes et al, 2002b) o los ratones se sacrificaron los días 6, 12 o 16 y se fijaron los pulmones en un 10 % de formalina, se embebieron, seccionaron y

tiñeron con H/E para el examen histológico o las secciones congeladas de pulmones se hicieron para el análisis inmunohistoquímica.

5 *Experimentos de nuevo desafío con el tumor.* Los ratones que sobrevivieron a largo plazo al tumor primario MDA-MB-435 (> 100 días) se volvieron a desafiar con una inyección i.v de 5×10^6 células tumorales humanas MDA-MB-435-erbB2 y se controló la supervivencia durante 100 días. La inyección de 5×10^6 células tumorales MDA-MB-435-erbB2 en ratones scid normales servía como control. En otro conjunto de experimentos los ratones se volvieron a desafiar con una inyección subcutánea de células 4T1.2-erbB2 de carcinoma mamario de ratón o células parentales 4T1.2 con 5×10^4 (dosis alta) o 5×10^3 (dosis baja). Se controló la supervivencia de los ratones diariamente y se definió como el periodo sin signos aparentes de malestar (letargia, respiración laboriosa, apariencia de encogimiento o acurrucamiento), según evaluación de dos observadores independientes. El crecimiento del tumor subcutáneo se midió mediante un calibre cuadrado a lo largo del eje perpendicular de los tumores. Los datos se registraron como el porcentaje de supervivencia o la media del tamaño tumoral (mm^2 , como producto de dos diámetros perpendiculares) \pm SEM. La inyección de células 4T1.2-erbB2 y células tumorales parentales 4T1.2 en ratones scid normales a altas y 15 bajas dosis se incluyeron como controles en estos experimentos.

Ejemplo 2: Expresión del receptor scFv-CD28- ζ en células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas primarias de ratón.

20 En consonancia con los estudios de los solicitantes, los datos desvelados en el presente documento demuestran que la transducción retroviral de células T esplénicas estimuladas con PHA/IL-2 no fraccionadas que constantemente daban como resultado una alta proporción de células T CD8⁺ (80-85 %) pero un bajo número de células T CD4⁺ (10-15 %) (Fig. 1A y B) (Haynes et al, 2002a; Haynes et al, 2002b). Para determinar si la expresión del receptor quimérico anti-erbB2-CD28- ζ podía conseguirse en un gran porcentaje de las células T CD4⁺, se aislaron las células T CD8⁺ y CD4⁺ mediante privación por perlas magnéticas antes de la transducción. Utilizando esta 25 estrategia, era posible conseguir buenos niveles de expresión del receptor quimérico anti-erbB2-CD28- ζ en células T CD8⁺ y CD4⁺ después de la tinción con un anticuerpo anti-marcador c-myc (Fig. 1 D y F) en comparación con las células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas falsamente (Fig. 1 H y J). De manera importante, las poblaciones de células T consistían en más del 95 % de CD8⁺ o CD4⁺ después de la transducción (Fig. 1 C, E, G e I). Había una expresión insignificante del receptor quimérico en las poblaciones tanto de CD8⁻ como CD4⁻ (datos no mostrados).

30 **Ejemplo 3: Las células T CD8⁺ y CD4⁺ de ratón transducidas intervienen en la secreción de citocinas específicas de antígeno, la proliferación y la lisis de células tumorales.**

35 La capacidad funcional de las células T CD8⁺ o CD4⁺ transducidas se comparó en varios ensayos diferentes *in vitro*. Los solicitantes habían demostrado previamente la capacidad de las células T modificadas no fraccionadas scFv-CD28- ζ para secretar citocinas Tc1 (IFN- γ y GM-CSF) con la estimulación antigénica con células diana erbB2⁺ (Haynes et al, 2002b; Kershaw et al, 2004). Por lo tanto, tendría interés determinar el patrón de secreción de citocinas de las poblaciones de células T CD8⁺ y CD4⁺ aisladas transducidas con el receptor scFv-CD28- ζ . Después del co-cultivo con células tumorales MDA-MB-435-erbB2 las células T CD8⁺ transducidas producían altos niveles de citocinas Tc1 IFN- γ y GM-CSF (Fig. 2 A y B). Sin embargo, las células T CD4⁺ transducidas producían altos niveles de citocinas tanto Tc1 (IFN- γ , GM-CSF, IL-2) (Fig. 2 A, B y D) y Tc2 (IL-4) (Fig. 2 C). En consonancia con los estudios previos, las células T transducidas no fraccionadas producían altos niveles de citocinas IFN- γ y GM-CSF, pero no de IL-4 o IL-2 (Fig. 2 A-D). La secreción de citocinas por las células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas por scFv-CD28- ζ eran específicas de antígeno mientras que las transducidas co-cultivadas con las células tumorales 45 parentales erbB2⁺ MDA-MB-435 no presentaban una secreción de citocinas significativa. Además, las CD8⁺ y CD4⁺ transducidas falsamente co-cultivadas con cualquier línea celular no secretaban citocinas que pudieran medirse. También se presentaron resultados comparativos contra la línea celular de adenocarcinoma de colon de ratón MC38-erbB2 o la línea celular de carcinoma mamario de ratón 4T1.2-erbB2 (datos no mostrados). La capacidad proliferativa de las distintas poblaciones de células T transducidas con el receptor scFv-CD28- ζ se examinaron a continuación midiendo la incorporación de timidina [³H] después de la estimulación con un anticuerpo anti-marcador unido a la placa. De manera interesante no había una diferencia significativa en el nivel de proliferación observado por las células T CD4⁺, CD8⁺ transducidas o no fraccionadas después de la unión con el receptor y la proliferación por todas las poblaciones de células T transducidas era comparable a la estimulación mediante los receptores endógenos de célula T y CD28 (Fig. 2 E). No se observó proliferación en las células T CD4⁺, CD8⁺ o no fraccionadas transducidas falsamente después de la estimulación con un mA b anti-marcador (Fig. 2 E). Finalmente, se comparó la capacidad de las células T CD4⁺ y CD8⁺, no fraccionadas modificadas con el receptor scFv-CD28- ζ para intervenir en la lisis específica de las células diana MDA-MB-435-erbB2 en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr en 6 h. De manera interesante las células T CD8⁺ no fraccionadas transducidas intervenían más en la actividad citolítica de las células diana MDA-MB-435-erbB2 en comparación con las células T CD4⁺ transducidas (Fig. 2 F). No se observó ninguna lisis de las células tumorales parentales de erbB2-MDA-MB-435 por ninguna de las poblaciones de células T modificadas con el scFv-CD28- ζ y las células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas falsamente no podían lisar ninguna línea celular (Fig. 2 G). En conjunto, estos datos demostraban que ambas células T aisladas CD8⁺ y CD4⁺ podían transducirse eficazmente con el receptor scFv-CD28- ζ e intervienen en la liberación de citocinas específicas de antígeno, la proliferación y la actividad citolítica.

65 **Ejemplo 4: El aumento de la transferencia de células T CD4⁺ modificadas aumenta la supervivencia libre de**

tumores en los ratones.

La transferencia adoptiva de células T modificadas scFv- α -erbB2-CD28- ζ no fraccionadas que contenían -10 % de células T CD4⁺ transducidas en los ratones scid que tienen metástasis pulmonar de MDA-MB-435-erbB2 de 5 días presentaba previamente una supervivencia de ratones a largo plazo entre el 20-50 % (Haynes et al, 2002b). Para ensayar si el aumento de la proporción de células T CD4⁺ modificadas genéticamente aumenta la respuesta antitumoral en este modelo, se compararon la supervivencia de ratones tratados con las células T transducidas con scFv-CD28- ζ no fraccionadas (10^7) o el mismo número total de células T CD8⁺ y CD4⁺ (5×10^6 células de cada una). Sorprendentemente, el 100 % de los ratones que tenían metástasis pulmonar con MDA-MB-435-erbB2 de 5 días que recibieron una relación 1:1 de células T CD8⁺ y CD4⁺ modificadas con scFv-CD28- ζ sobrevivían en comparación con el 30 % de supervivencia de ratones tratados con células T transducidas no fraccionadas ($p < 0,005$) (Fig. 3 A). El aumento de la respuesta antitumoral era completamente dependiente de la transferencia de células T CD4⁺ dirigidas apropiadamente ya que los ratones tratados con una combinación 1:1 de células T CD8⁺ y células T CD4⁺ intactas o células T CD8⁺ transducidas y células T CD4⁺ modificadas con un receptor scFv- α -CEA- γ irrelevante no sobrevivían más allá de 20 días (Fig. 3 B). De manera interesante, no se observó ningún efecto antitumoral en los ratones que recibieron o células T CD4⁺ o CD8⁺ transducidas solas indicando una necesidad de cooperación de los dos tipos de células T (Fig. 3 A). Además, los ratones que recibieron una relación 1:1 de células T CD4⁺ y CD8⁺ transducidas de especificidad irrelevante o sin células T no sobrevivieron (Fig. 3 A).

Ejemplo 5: Detección de las células CD8⁺ y CD4⁺ *in vivo*.

Debido a la respuesta sorprendente de las células T CD8⁺ y CD4⁺ modificadas transferidas adoptivamente contra metástasis pulmonares establecidas, los solicitantes investigaron si las células T transducidas se podrían detectar en el sitio del tumor. La tinción con Hematoxilina y Eotaxina (H/E) de secciones del pulmón de ratón 16 días después de la inoculación del tumor presentaban una reducción significativa en la carga tumoral del pulmón en los ratones tratados con una transferencia 1:1 de células T CD8⁺ y CD4⁺ modificadas con scFv- α -erbB2-CD28- ζ en comparación con las células T de control (Fig. 5 A y D). Por el contrario, el número de ratones que responden después de la transferencia de células T no fraccionadas transducidas se reducía significativamente como se demostró mediante dos secciones de pulmón con H/E representativas del día 16 (Fig. 5 B y C). La microscopía confocal después de la tinción inmunohistoquímica demostraba la presencia de células tanto CD8⁺ como CD4⁺ en las secciones de pulmón el día 16 de ratones tratados con la transferencia 1:1 de células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas (Fig. 5 E). La detección de tinción de marcador D en las secciones pulmonares de los ratones tratados sugería que estas células T estaban expresando el receptor quimérico scFv-CD28- ζ (Fig. 5 I). Como se había demostrado previamente (Kershaw et al, 2004), solo se detectaron células T CD8⁺ y tinción positiva a marcador D en los pulmones de ratones que respondieron al tratamiento con células T no fraccionadas (Fig. 5 F y J). No se observó tinción en ratones que no respondían al tratamiento con la transferencia de células T no fraccionadas (Fig. 5 G y K). Además, no se observó ninguna detección de células T CD8⁺ y CD4⁺ de control en las secciones pulmonares de ratones (Fig. 5 H y L). De manera interesante, ni las células T CD8⁺ o CD4⁺ transducidas inyectadas solas se detectaban en secciones pulmonares del día 16 lo cual era coincidente con el efecto no antitumoral observado en estos ratones (datos no mostrados). Como controles, se detectaron células T CD8⁺ y CD4⁺ en los bazo de ratones BALB/c utilizando el mismo procedimiento de tinción inmunohistoquímica, pero no en los pulmones de ratones scid normales (datos no mostrados).

Para evaluar adicionalmente la persistencia de células T transducidas en ratones de supervivencia a largo plazo, se llevó a cabo la amplificación por PCR del gen de neomicina. La presencia de un fragmento de 400 pb correspondiente al gen de neomicina en sangre periférica y bazo de los ratones que sobrevivieron al tumor durante >100 días después del tratamiento con células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas indicaba que estas células T podían persistir a largo plazo incluso después de la erradicación del tumor (Fig. 5 M). El gen de neomicina no se detectó en sangre periférica y bazo de ratones BALB/c o scid normales (Fig. 5 M). La persistencia de estas células T se apoyó adicionalmente por citometría de flujo que demostró la presencia de células T CD8⁺ y CD4⁺ en la sangre periférica de ratones de supervivencia a largo plazo (datos no mostrados). En total, estos datos sugieren fuertemente que el efecto antitumoral en los ratones dependía de la localización en el sitio del tumor y la persistencia a largo plazo de las células T CD8⁺ y CD4⁺ modificadas transferidas adoptivamente.

Ejemplo 6: Respuesta específica de antígeno a un nuevo desafío con el tumor.

Un problema importante con respecto a cualquier terapia del cáncer es si el tratamiento específico puede inducir una respuesta secundaria a la recaída tumoral. Para ensayar si la estrategia scFv descrita en el presente documento podría intervenir eficazmente en una respuesta a un nuevo desafío al tumor secundario, los ratones de supervivencia a largo plazo (>100 días) que se trataron inicialmente con las células T CD8⁺ y CD4⁺ transducidas se inyectaron con una dosis i.v de 5×10^6 células tumorales MDA-MB-435-erbB2. Extraordinariamente, todos los ratones eran capaces de erradicar totalmente una segunda dosis de tumor MDA-MB-435-erbB2 (Fig. 6 A). Los ratones scid normales inyectados con células MDA-MB-435-erbB2 no sobrevivían (Fig. 6 A). A modo de ensayo adicional de especificidad, se volvieron a desafiar los ratones de supervivencia a largo plazo con una dosis subcutánea (5×10^4) de células tumorales de carcinoma mamario de ratón que expresan en antígeno erbB2 humano (4T1.2-erbB2) o las células parentales 4T1.2. Como se ha demostrado anteriormente, todos los ratones podían inhibir significativamente el

crecimiento s.c. del tumor 4T1.2-erbB2 en comparación con las células tumorales parentales 4T1.2 y su supervivencia se prolongó significativamente (Fig. 6 B y C). El crecimiento s.c de células tumorales 4T1.2-erbB2 o parentales 4T1.2 en los ratones scid normales no se inhibía comparativamente (Fig. 6 B y C). Para determinar si los ratones de supervivencia a largo plazo erradicaban totalmente una dosis menor del tumor 4T1.2-erbB2, se volvieron a desafiar los ratones con 5×10^3 células tumorales 4T1.2-erbB2. Sorprendentemente, el crecimiento s.c de 4T1.2-erbB2 a esta dosis menor se inhibía totalmente en comparación con la inyección s.c de 5×10^4 células tumorales 4T1.2-erbB2 (Fig. 6 D). El crecimiento s.c de las células tumorales 4T1.2-erbB2 o parentales 4T1.2 a dosis tanto altas como bajas no estaba afectado en los ratones scid de control (Fig. 6 D). Estos resultados han demostrado claramente por primera vez que los ratones tratados con células T modificadas genéticamente podían montar una respuesta secundaria específica de antígeno potente y sostenida a un nuevo desafío tumoral.

Ejemplo 7: Inmunoterapia adoptiva de un ser humano.

A continuación, hay un ejemplo profético no limitante que describe un método de inmunoterapia adoptiva en un sujeto humano.

El día 0 se aislará sangre periférica del paciente mediante aféresis. Las células se estimularán con OKT3 e IL-2 de acuerdo con protocolos convencionales conocidos en la técnica.

El día 3, se producirán subconjuntos de células T CD8 y CD4 mediante clasificación celular activada por fluorescencia. Las células T se transducirán entonces con un vector retroviral para que expresen el receptor quimérico scFv-CD28- ζ .

El día 4, se repetirá la transducción para aumentar la proporción de células T transducidas en cada subconjunto.

A partir del día 5 al día 18 se cultivarán adicionalmente y expandirán las células y se mantendrán a $1-2 \times 10^6$ /ml, añadiendo IL-2 cada 2-3 días.

El día 18 las células se estimularán con PBMC alógenas, OKT3 e IL-2, y entonces se cultivarán y expandirán (manteniendo el tratamiento de IL-2).

El día 36, se recolectarán aproximadamente 10^8 a 10^{12} células y se infundirán en el paciente por vía intravenosa.

Todo el procedimiento desde el día 0 al día 36 se puede repetir dos o tres veces dependiendo de la respuesta del tumor o la infección. Además, se puede proporcionar una terapia de mantenimiento con una base semi-regular.

Referencias

Cohen, J.L., O. Boyer, V. Thomas-Vaslin, y D. Klatzmann. 1999. Suicide gene mediated modulation of graft-versus-host disease. *Leuk Lymphoma* 34:473-480.

Darcy, P.K., M.H. Kershaw, J.A. Trapani, y M.J. Smyth. 1998. Expression in cytotoxic T lymphocytes of a single-chain anti-carcinoembryonic antigen antibody. Redirected Fas ligand-mediated lysis of colon carcinoma. *Eur J Immunol* 28:1663-1672.

Darcy, P.K., N.M. Haynes, M.B. Snook, J.A. Trapani, L. Cerruti, S.M. Jane, y M.J. Smyth. 2000. Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL. *J Immunol* 164:3705-3712.

Dudley, M.E., J. Wunderlich, M.I. Nishimura, D. Yu, J.C. Yang, S.L. Topalian, D.J. Schwartzentruber, P. Hwu, F.M.

Marincola, R. Sherry, S.F. Leitman, y S.A. Rosenberg. 2001. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24:363-373.

Dudley, M.E., J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, R. Sherry, N.P. Restifo, A.M. Hubicki, M.R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C.A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, D.E. White, y S.A. Rosenberg. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-854.

Finney, H.M., A.D. Lawson, C.R. Bebbington, y A.N. Weir. 1998. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene-product. *J Immunol* 161:2791-2797

Finney, H.M., A.N. Akbar, y A.D. Lawson. 2004. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain, *J Immunol* 172:104-113.

- Garrido, F., T. Cabrera, A. Concha, S. Glew, F. Ruiz-Cabello, y P.L. Stern. 1993. Natural history of HLA expression during tumor development. *Immunol Today* 14:491-499.
- 5 Gyobu, H., T. Tsuji, Y. Suzuki, T. Ohkuri, K. Chamo-to, M. Kuroki, H. Miyoshi, Y. Kawarada, H. Katoh, T. Takeshima, y T. Nishimura. 2004. Generation and targeting of human tumor-specific Tc1 and Th1 cells transduced with a lentivirus containing a chimeric immunoglobulin T-cell receptor. *Cancer Res* 64:1490-1495.
- 10 Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M.P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C.S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J.I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L.E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T.H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, y M. Cavaz-zana-Calvo. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419.
- 15 Haynes, N.M., M.B. Snook, J.A. Trapani, L. Cerruti, S.M. Jane, M.J. Smyth, y P.K. Darcy. 2001. Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma. *J Immunol* 166:182-187.
- 20 Haynes, N.M., J.A. Trapani, M.W. Teng, J.T. Jackson, L. Cerruti, S.M. Jane, M.H. Kershaw, M.J. Smyth, y P.K. Darcy. 2002a. Rejection of Syngeneic Colon Carcinoma-by CTLs Expressing Single Chain Antibody Receptors Codelivering CD28 Costimulation. *J Immunol* 169:5780-5786.
- 25 Haynes, N.M., J.A. Trapani, M.W. Teng, J.T. Jackson, L. Cerruti, S.M. Jane, M.H. Kershaw, M.J. Smyth, y P.K. Darcy. 2002b. Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. *Blood* 100:3155-3163.
- 30 Hombach, A., C. Heuser, T. Marquardt, A. Wiecek-zarkowicz, V. Groneck, C. Pohl, y H. Abken. 2001a. CD4+ T cells engrafted with a recombinant immunoreceptor efficiently lyse target cells in a MHC antigen- and Fas-independent fashion. *J Immunol* 167:1090-1096.
- 35 Hombach, A., A. Wiecek-zarkowicz, T. Marquardt, C. Heuser, L. Usai, C. Pohl, B. Seliger, y H. Abken. 2001b. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol* 167:6123-6131.
- Hwu, P., J.C. Yang, R. Cowherd, J. Treisman, G.E. Shafer, Z. Eshhar, y S.A. Rosenberg. 1995. In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res* 55:3369-3373.
- 40 Kershaw, M.H., J.T. Jackson, N.M. Haynes, M.W. Teng, M. Moeller, Y. Hayakawa, S.E. Street, R. Cameron, J.E. Tanner, J.A. Trapani, M.J. Smyth, y P.K. Darcy. 2004. Gene-engineered T cells as a superior adjuvant therapy for metastatic cancer. *J Immunol* 173:2143-2150.
- 45 Mitsuyasu, R.T., P.A. Anton, S.G. Deeks, D.T. Scad-den, E. Connick, M.T. Downs, A. Bakker, M.R. Roberts, C.H. June, S. Jalali, A.A. Lin, R. Pennathur-Das, y K.M. Hege. 2000. Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human-immunodeficiency-virus-infected subjects. *Blood* 96:785-793.
- 50 Moeller, M., N.M. Haynes, J.A. Trapani, M.W. Teng, J.T. Jackson, J.E. Tanner, L. Cerutti, S.M. Jane, M.H. Kershaw, M.J. Smyth, y P.K. Darcy. 2004. A functional role for CD28 costimulation in tumor recognition by single-chain receptor-modified T cells. *Cancer Gene Ther* 11:371-379.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, y S. Sakaguchi. 1999. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163:5211-5218.
- 55 Steitz, J., J. Bruck, J. Lenz, J. Knop, y T. Tuting. 2001. Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res* 61:8643-8646.
- 60 Taniguchi, T., e Y. Minami. 1993. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 73:5-8.
- Teng, M.W., M.H. Kershaw, M. Moeller, M.J. Smyth, y P.K. Darcy. 2004. Immunotherapy of cancer using systemically delivered gene-modified human T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 15:699-708.
- 65 Theze, J., P.M. Alzari, y J. Bertoglio. 1996. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today* 17:481-486.

Rosenberg, S.A., P. Spiess, y R. Lafreniere. 1986. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233:1318-1321.

5 Thomis, D.C., S. Markt, C. Bonini, C. Traversari, M. Gilman, C. Bordignon, y T. Clackson. 2001. A Fas-based suicide switch in human T cells for the treatment of graft-versus-host disease. *Blood* 97:1249-1257.

10 Yee, C., J.A. Thompson, D. Byrd, S.R. Riddell, P. Roche, E. Celis, y P.D. Greenberg. 2002. Adoptive T cell therapy using antigen specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and anti-tumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16168-16173.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método la inyección sistémica de la composición, comprendiendo la composición células, en donde las células consisten en (a) una población de células T CD4+, comprendiendo la población células T CD4+ modificadas para que expresen una molécula capaz de unirse a un antígeno sobre una célula diana del cáncer; y (b) una población de células T CD8+, comprendiendo la población células T CD8+ modificadas para que expresen la molécula capaz de unirse al antígeno sobre una célula diana del cáncer; en donde la relación de células T CD4+ modificadas con respecto a células T CD8+ modificadas en la composición es mayor de 1:3 y menor de 3:1.
2. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1; en donde la relación de células T CD4+ con respecto a las células T CD8+ en la composición es mayor de 1:3 y menor de 3:1.
3. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el número de células T CD4+ modificadas en la composición es mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 , $7,5 \times 10^6$ y 9×10^6 , y en donde el número de células T CD8+ modificadas en la composición es mayor que un número seleccionado de entre el grupo que consiste en 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 , $7,5 \times 10^6$ y 9×10^6 .
4. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el número de células T CD4+ modificadas en la composición es de entre 10^8 y 10^{12} y en donde el número de células T CD8+ modificadas en la composición está entre 10^8 y 10^{12} .
5. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde cada uno de entre el número de células T CD4+ modificadas y el número de células T CD8+ modificadas está entre 10^{10} y 10^{11} .
6. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la relación de células T CD4+ modificadas respecto a células T CD8+ modificadas en la composición es de 1:1.
7. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la molécula capaz de unirse al antígeno está codificada por una secuencia de nucleótido que comprende una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos derivada de TCR- ζ y/o que comprende una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos derivada del dominio de señalización co-estimulante CD28.
8. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde la molécula está codificada por una construcción génica quimérica que codifica un fragmento variable de cadena sencilla de un anticuerpo (scFv), una región transmembrana y citoplasmática de una cadena de señalización CD28 y una región citoplasmática de un receptor de célula T, y en donde el scFv es capaz de unirse al antígeno sobre la célula diana.
9. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el receptor de célula T es TCR- ζ .
10. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9 en donde la construcción génica quimérica codifica adicionalmente una región de bisagra de CD8 proximal a la membrana.
11. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el antígeno se encuentra en o sobre una célula tumoral.
12. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el antígeno se selecciona de entre erbB2, Cd19, Le^y, EGFR, PMSA, G250, NY-ESO1, CD20, idiotipo de Ig, p53, ras, CEA, MUC1, GD2 y HuD.
13. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con una reivindicación cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento o la prevención del cáncer son para la recaída del cáncer.
14. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en donde las células de la composición se derivan de un tejido inmunitario o de un tejido tumoral del sujeto y la relación de células T CD4+ con respecto a células T CD8+ de la composición está aumentada en comparación con la relación de células T CD4+ respecto a células T CD8+ en el tejido inmunitario o

en el tejido tumoral del sujeto.

- 5 15. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tejido inmunitario o el tejido tumoral se seleccionan de entre el grupo que consiste en sangre, bazo, timo, ganglios linfáticos o médula ósea.
16. Una composición para su uso en un método de tratamiento o prevención de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el tejido es sangre o un tejido tumoral.
- 10 17. Uso de una composición para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto, comprendiendo la composición células, en donde las células consisten en (a) una población de células T CD4+, comprendiendo la población células T CD4+ modificadas para que expresen una molécula capaz de unirse a un antígeno en una célula diana del cáncer; y (b) una población de células T CD8+, comprendiendo la población células T CD8+ modificadas para que expresen la molécula capaz de unirse al antígeno sobre la célula diana del cáncer; en donde la relación de células T CD4+ modificadas con respecto a la células T CD8+ modificadas en la composición es mayor de 1:3 y menor de 3:1, y en donde el tratamiento o la prevención de un cáncer implican la inyección sistémica de la composición.
- 15 18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que las células de la composición se derivan de un tejido inmunitario o de un tejido tumoral del sujeto y la relación de células T CD4+ con respecto a células T CD8+ de la composición está aumentada en comparación con la relación de células T CD4+ respecto a células T CD8+ en el tejido inmunitario o el tejido tumoral del sujeto.
- 20 19. Uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el tejido inmunitario o el tejido tumoral se seleccionan de entre el grupo que consiste en sangre, bazo, timo, ganglios linfáticos, o médula ósea.
- 25 20. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que el tejido es sangre o un tejido tumoral.

FIGURA 1

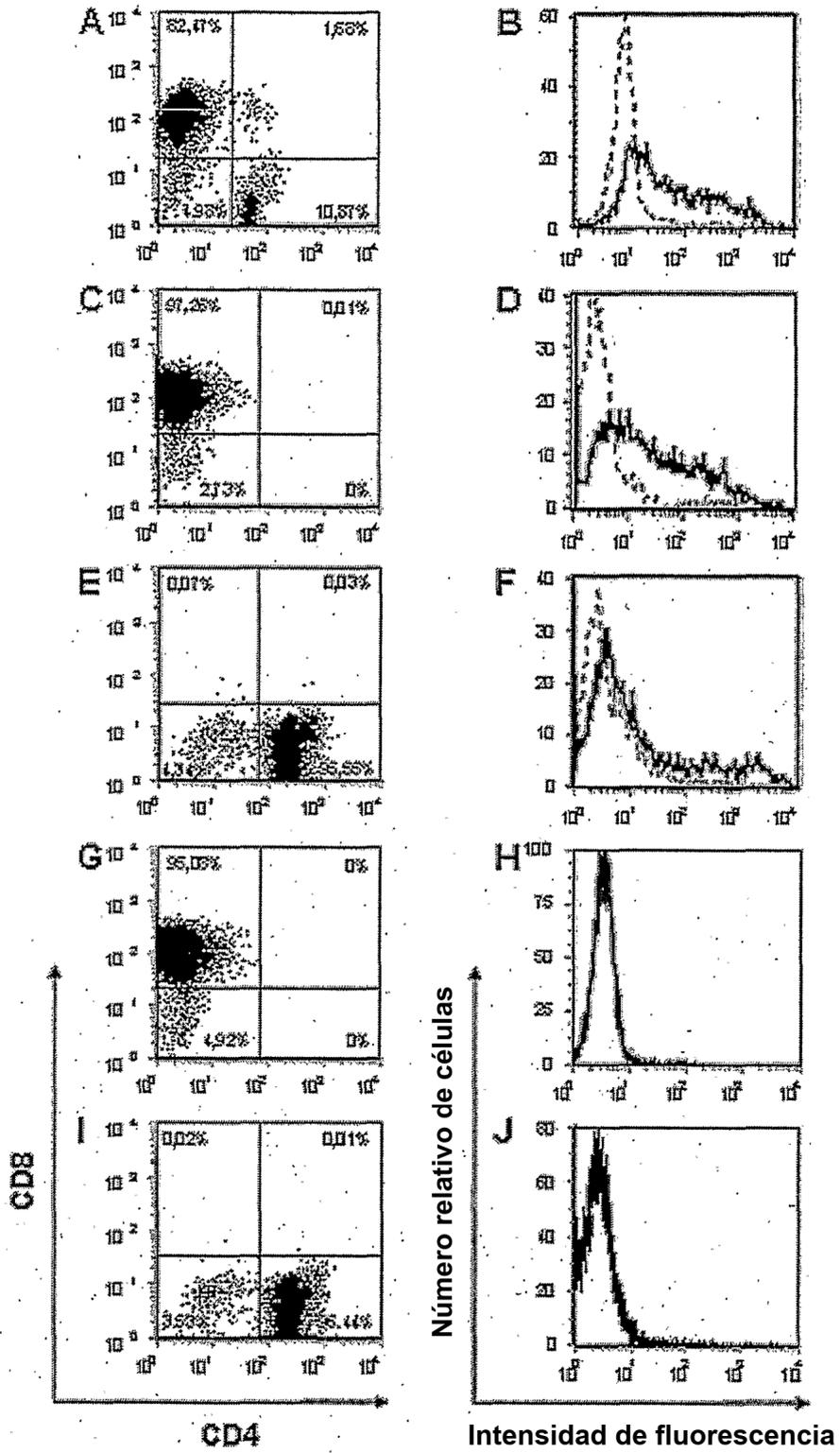


FIGURA 2

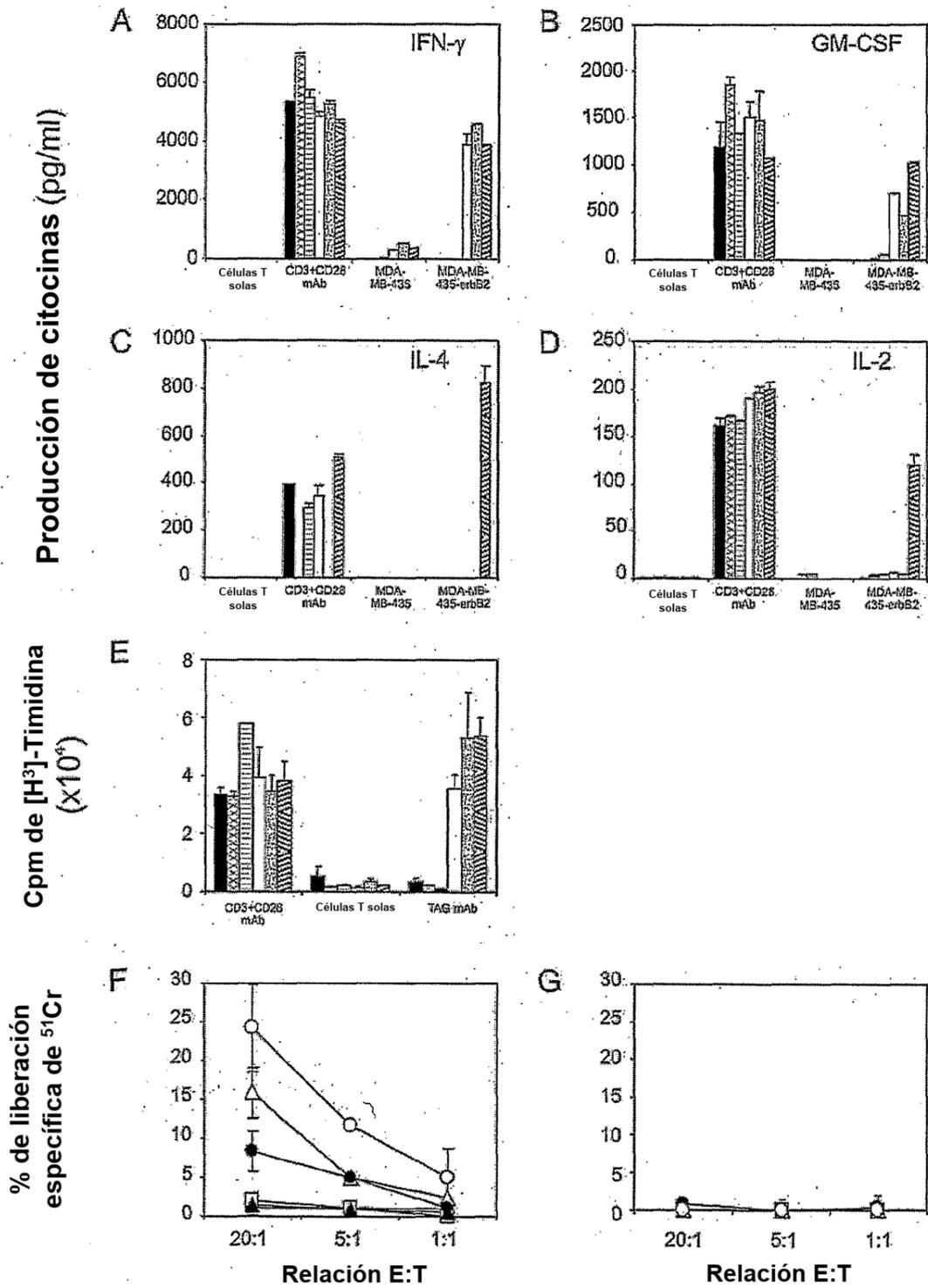


FIGURA 3

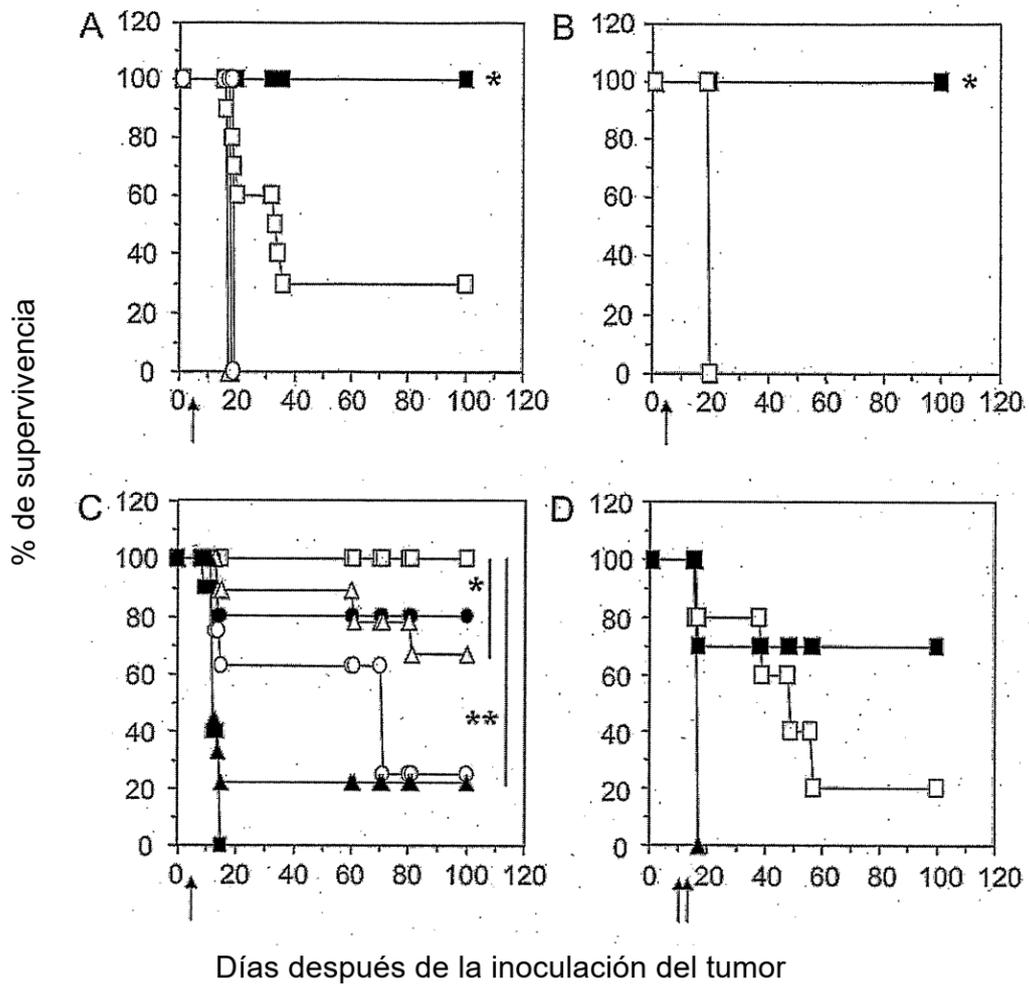
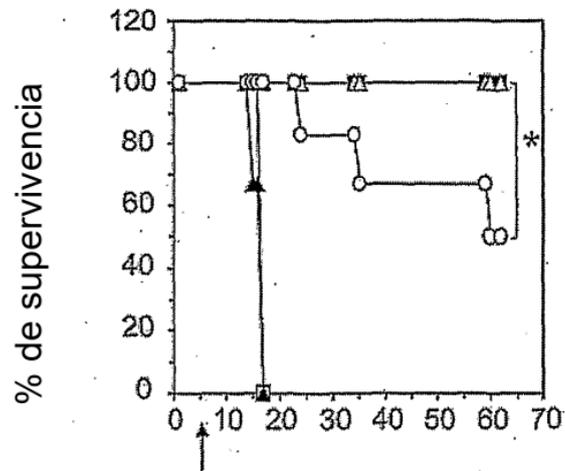


FIGURA 4



Días después de la inoculación del tumor

FIGURA 5

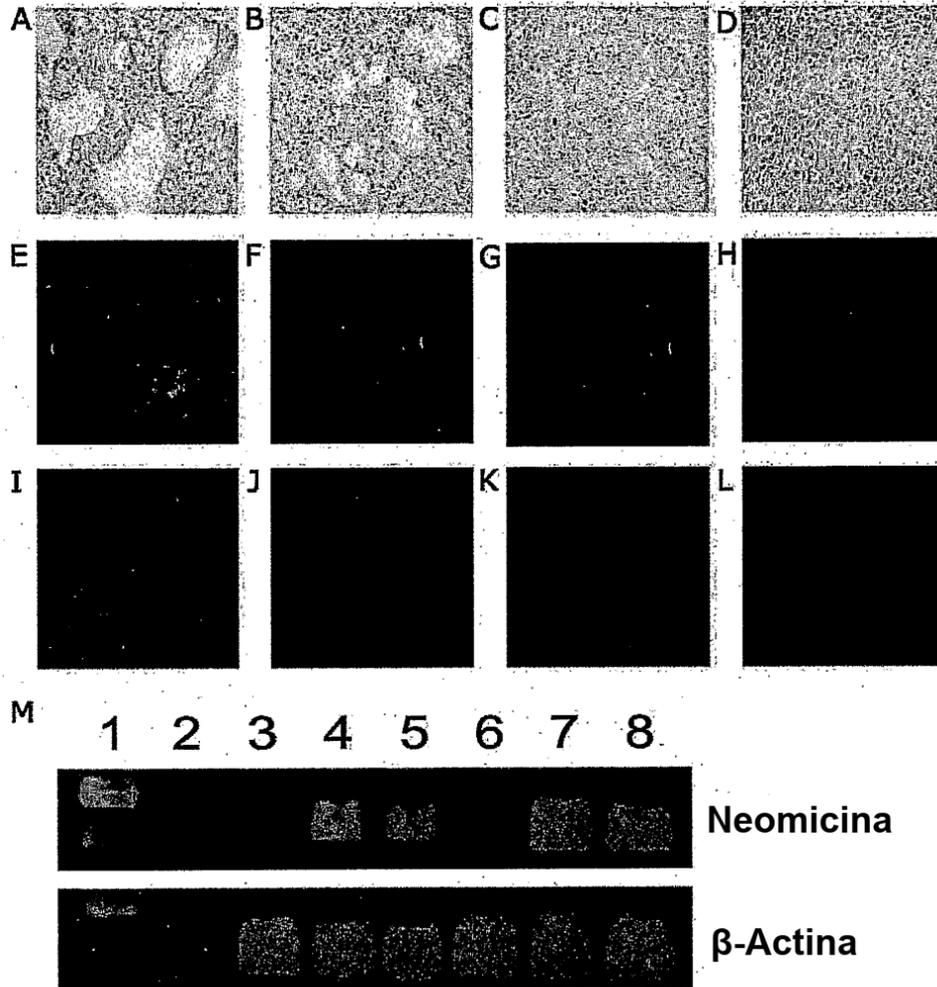


FIGURA 6

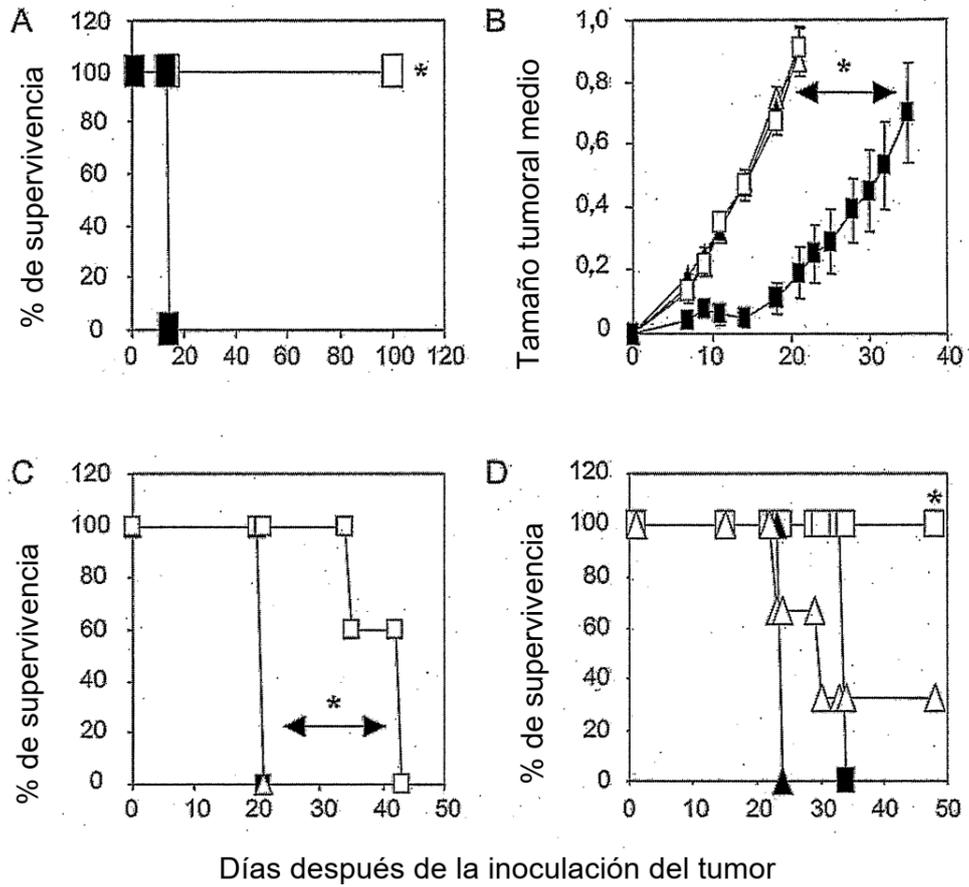


FIGURA 7

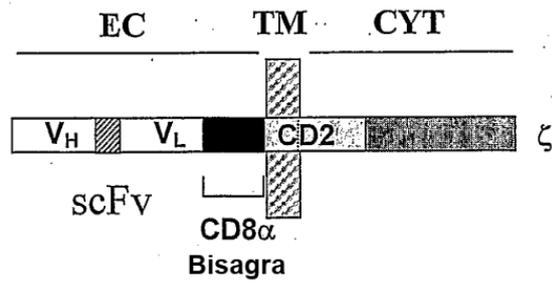


FIGURA 8

Aislamiento y enriquecimiento de células T esplénicas de ratón pasando a través de una columna de lana de nailon



Mezcla con perlas marcadas con CD4 o CD8 y paso a través de la columna de privación MACS para aislar los subconjuntos CD8 o CD4



Transducción retroviral de células T CD8 y CD4 con el receptor scFv-CD28- ζ



Ensayo de la expresión del receptor scFv-CD28- ζ en células T CD8 y CD4 mediante citometría de flujo



Ensayo *in vitro* de la función de células T modificadas genéticamente por liberación de citocinas específicas de antígeno (ELISA), proliferación (incorporación de Timidina ^3H) y citotoxicidad (liberación de ^{51}Cr)



Ensayo de eficacia *in vivo* por transferencia adoptiva de células T CD8 $^+$ (5×10^6) y CD4 $^+$ (5×10^6) modificadas con scFv-CD28- ζ el día 0,1 en ratones que tienen enfermedad temprana o en momentos retrasados (es decir, los días 5 o 10) para ensayar contra un tumor más establecido



Ensayo de persistencia de células T modificadas genéticamente mediante citometría de flujo y PCR, y localización de las células T en el sitio del tumor mediante tinción con Hematoxilina y Eosina e inmunohistoquímica



Nuevo desafío a los ratones de supervivencia a largo plazo para ensayar la respuesta de reclutamiento específico de antígeno por las células T modificadas genéticamente