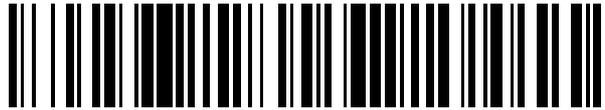


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 548**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)

**A61K 35/14** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2014 PCT/US2014/046478**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15009604**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2014 E 14745056 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3022294**

54 Título: **Métodos de preparación de células T anti-antígeno de virus del papiloma humano**

30 Prioridad:

**15.07.2013 US 201361846161 P**

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

**13.07.2020**

73 Titular/es:

**THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE  
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND  
HUMAN SERVICES (100.0%)  
Office of Technology Transfer, National Institutes  
of Health, 6011 Executive Boulevard, Suite 325,  
MSC 7660  
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**HINRICHS, CHRISTIAN S. y  
ROSENBERG, STEVEN A.**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 773 548 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 de preparación de células T anti-antígeno de virus del papiloma humano

5 **Antecedentes de la invención**

La causa primaria de algunos tipos de cáncer tales como, por ejemplo, cáncer del cuello uterino, es la infección por virus del papiloma humano (VPH).

- 10 Se ha descrito un estudio de fase II de linfopenia seguida por la inyección de linfocitos de infiltración tumoral (TIL) autólogos y posterior aldesleukina en dosis alta para cánceres asociados con VPH (ClinicalTrials.gov, NCT01585428, 24 de abril de 2012). Heusinkveld *et al.*, 2012, Int. J. Cancer, vol. 131(2), E75-E85 describen la inmunidad de células T específicas de VPH 16 sistémicas y locales en pacientes con cáncer de cuello y cabeza. Se ha descrito una actividad lítica autóloga altamente específica de TIL de carcinoma de cuello uterino, en la que
- 15 está implicado un reconocimiento de antígeno de superficie asociado con CD3, por Hilders *et al.* en 1994 (Int. J. Cancer, vol. 57, 805-813). El documento US 2011/052530 A1 describe un método de fomentar la regresión de un cáncer en un mamífero usando células T autólogas expandidas *in vitro* junto con quimioterapia no mieloablativa que produce linfopenia, tras lo cual se fomenta la regresión del cáncer en el mamífero. Además, Rosenberg *et al.* trataron a 93 pacientes con melanoma metastásico medible con la transferencia adoptiva de TIL autólogos
- 20 administrados junto con interleucina 2 tras un régimen preparativo que producía linfopenia. A partir del estudio se concluyó que la terapia de transferencia celular con TIL autólogos puede mediar en respuestas completas duraderas en estos pacientes y tiene una eficacia similar independientemente del tratamiento anterior (Rosenberg *et al.*, 2011, Clin. Cancer Res., vol. 17(13), 4550-4557).
- 25 A pesar de los avances en tratamientos tales como quimioterapia, el pronóstico para muchos cánceres, incluyendo cánceres asociados con VPH, puede ser malo. Por consiguiente, existe una necesidad no cumplida de tratamientos adicionales para el cáncer, particularmente cánceres asociados con VPH.

**Breve resumen de la invención**

- 30 Un aspecto de la invención proporciona un método de preparación de una población de células T específicas de VPH, comprendiendo el método: dividir una muestra de tumor positiva para VPH en múltiples fragmentos; cultivar por separado los múltiples fragmentos en presencia de tan sólo una citocina, en el que la citocina es interleucina (IL)-2, IL-7, IL-15 o IL-12; obtener células T a partir de los múltiples fragmentos cultivados; someter a prueba por separado las células T de los múltiples fragmentos para detectar uno o ambos de reconocimiento de tumor
- 35 positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; seleccionar las células T que muestran uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; y expandir el número de células T seleccionadas para producir una población de células T específicas de VPH.

- 40 Una realización de la invención proporciona un método de preparación de una población de células T específicas de VPH, comprendiendo el método: dividir una muestra de tumor positiva para VPH en múltiples fragmentos; cultivar por separado los múltiples fragmentos en presencia de tan sólo una citocina, en el que la citocina es interleucina (IL)-2, IL-7, IL-15 o IL-12; obtener células T a partir de los múltiples fragmentos cultivados; someter a prueba por separado las células T de los múltiples fragmentos para detectar uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; seleccionar las células T que muestran uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; y expandir el número de células T seleccionadas usando una o ambas de (i) células
- 45 alimentadoras alogénicas irradiadas y (ii) células alimentadoras autólogas irradiadas y uno o ambos de (iii) anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón y (iv) interleucina (IL)-2 para producir una población de células T específicas de VPH.

- Otro aspecto de la invención proporciona una población de células T específicas de VPH preparadas según un método que comprende: dividir una muestra de tumor positiva para VPH en múltiples fragmentos; cultivar por separado los múltiples fragmentos en presencia de tan sólo una citocina, en la que la citocina es IL-2; obtener células T a partir de los múltiples fragmentos cultivados; someter a prueba por separado las células T de los múltiples fragmentos para detectar uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; seleccionar las células T que muestran uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; expandir el número de células T seleccionadas para producir una población de células T específicas de VPH para terapia celular adoptiva; para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer en un mamífero, opcionalmente en la que el cáncer es un cáncer positivo para VPH.
- 55
- 60

**Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos**

- 65 La figura 1A es un gráfico que muestra interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (pg/ml) secretado mediante linfocitos de

infiltración tumoral (TIL) efectores generados a partir de 22 fragmentos tumorales (F1-F22) del paciente 1 o TIL de melanoma tras el cultivo conjunto con una combinación de péptido gp100 diana (barras sombreadas) o una combinación de péptidos de E7 de VPH 18 (barras sin sombrear).

5 La figura 1B es un gráfico que muestra IFN- $\gamma$  (pg/ml) secretado mediante TIL efectores de melanoma o TIL generados a partir de 22 fragmentos tumorales (F1-F22) del paciente 1 tras el cultivo conjunto con una línea de células tumorales autólogas diana (barras sin sombrear) o células 624 (una línea celular de melanoma) (barras sombreadas).

10 La figura 2A es un gráfico que muestra IFN- $\gamma$  (pg/ml) secretado mediante TIL efectores generados a partir del fragmento tumoral F16, F17 o F22 del paciente 1, o mediante las células administradas al paciente para el tratamiento ("bolsa de infusión") tras el cultivo conjunto con células tumorales autólogas diana (barras sombreadas), células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de tejido autólogo (barras con líneas diagonales directas), células tumorales coincidentes en todos los loci de clase I (barras con líneas diagonales invertidas), células HeLa de coincidencia errónea con HLA (barras con líneas verticales) o células CaSki de coincidencia errónea con HLA (barras con líneas horizontales).

La figura 2B es un gráfico que muestra IFN- $\gamma$  (pg/ml) secretado mediante TIL efectores del paciente 1 cultivados solos (sin tumor) o tras el cultivo conjunto con células tumorales autólogas que se transfectaron con ARN de silenciamiento frente a HLA-A, HLA-B, HLA-C, o ARN frente a una diana irrelevante (sin direccionamiento).

20 La figura 2C es un gráfico que muestra IFN- $\gamma$  (pg/ml) secretado mediante TIL efectores tras el cultivo conjunto con células diana (efector/dianas: TIL del paciente 1/células tumorales autólogas; DMF5/células 624; o F15/VPH18E6<sub>121-135</sub>) sin anticuerpo (barras negras), con anticuerpo anti-HLA-A2 (barras con líneas diagonales invertidas) o con anticuerpo anti-clase II (barras con líneas diagonales directas). Las barras blancas indican células efectoras cultivadas solas.

La figura 3 es un gráfico que muestra IFN- $\gamma$  (pg/ml) secretado mediante TIL efectores a partir del fragmento tumoral F16 o F22 del paciente 1; células administradas al paciente para el tratamiento ("bolsas de infusión"); TIL de melanoma 1, 2 ó 3 (TIL cultivados a partir de tumores de melanoma); TCR de mE7 (células T transducidas para expresar un TCR frente a E7<sub>11-19</sub> de VPH 16); o TIL de otro paciente que eran reactivos frente a E6<sub>121-135</sub> de VPH 18, restringidos a clase II, y por tanto podían bloquearse con HB145) tras el cultivo conjunto con una combinación de péptido gp100 (barras blancas), anticuerpo OKT3 (barras con líneas horizontales) o células dendríticas (DC) pulsadas con una combinación de péptidos de E7 de VPH 18 (barras negras), combinación de péptidos de E7 de VPH 18 y W6/32 (barras con líneas diagonales directas delgadas), E7<sub>11-19</sub> de VPH 16 (barras con líneas diagonales directas gruesas), E7<sub>11-19</sub> de VPH 16 y W6/32 (barras con cuadrados), E7<sub>11-19</sub> de VPH 16 y HB145 (barras con rayas perpendiculares), E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 (barras con líneas diagonales invertidas), E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 y W6/32 (barras con rayas cruzadas) o E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 y HB 145 (barras con rectángulos negros con contorno blanco).

30 Las figuras 4A y 4B son gráficos que muestran IFN- $\gamma$  (pg/ml) secretado mediante clones 1-24 (A) o clones 24-48 (B) de TIL efectores que se clonaron a partir del fragmento tumoral F16 del paciente 1 tras el cultivo conjunto con una combinación de péptido gp100 (barras grises) o una combinación de péptidos de E7 de VPH 18 (barras negras).

45 La figura 5 es un gráfico que muestra IFN- $\gamma$  (pg/ml) secretado mediante TIL efectores a partir de 36 fragmentos tumorales diferentes (F1-F36) del paciente 12 o TIL de melanoma (DM5) (control) tras el cultivo conjunto con células dendríticas pulsadas con la combinación de péptidos de E6 de VPH 18 (barras negras), la combinación de péptidos de E7 de VPH 18 (barras grises) o una combinación de péptido gp100 (control).

50 La figura 6 es un gráfico que muestra IFN- $\gamma$  (pg/ml) secretado mediante TIL efectores generados a partir del fragmento tumoral F1 del paciente 12, o TIL de melanoma 1, 2 ó 3, tras el cultivo conjunto con DC que se transdujeron con un vector lentiviral que codificaba para proteína verde fluorescente (GFP) (barras blancas) o E6 de VPH 18 (barras grises) o se pulsaron con una combinación de péptido gp100 (barras con líneas diagonales directas) o una combinación de péptidos de E6 de VPH 18 (barras con líneas diagonales invertidas). Las barras con rayas horizontales indican TIL cultivados con anticuerpo OKT3.

55 La figura 7A es un gráfico que muestra factor de necrosis tumoral (TNF) $\alpha$  (pg/ml) secretado mediante los clones 1, 3, 12 y 20 tras el cultivo solos (barras grises) o con una combinación de péptidos de E6 de VPH18 (barras negras).

60 La figura 7B es un gráfico que muestra TNF $\alpha$  (pg/ml) secretado mediante los clones 3, 12 y 20 tras el cultivo solos (barras blancas) o con una combinación de péptidos de E6 de VPH18 (barras grises) o con subcombinación 1 (barras con líneas diagonales directas), subcombinación 2 (barras con líneas diagonales invertidas), subcombinación 3 (barras con líneas horizontales), subcombinación 4 (barras con líneas verticales) o

subcombinación 5 (barras negras) de péptido de E6 de VPH 18.

5 La figura 7C es un gráfico que muestra  $TNF\alpha$  (pg/ml) secretado mediante los clones 3, 12 y 20 tras el cultivo solos (barras blancas) o con un péptido 30 (barras con puntos), péptido 31 (barras negras), péptido 32 (barras grises), péptido 33 (barras con líneas verticales), péptido 34 (barras con líneas diagonales directas), péptido 35 (barras con líneas diagonales invertidas), péptido 36 (barras con cuadrados) o péptido 37 (barras con espinapez) de E6 de VPH 18.

10 Las figuras 8A-8C son gráficos que muestran  $TNF\alpha$  (pg/ml) secretado mediante los clones 3 (A), 12 (B) y 20 (C) tras el cultivo conjunto con PBMC autólogas (P12) o PBMC de uno de los donantes 1-6.

15 La figura 9A es un gráfico que muestra  $IFN-\gamma$  (pg/ml) secretado mediante el clon 3 de fragmento tumoral F15 del paciente 12 tras el cultivo conjunto con PBMC autólogas (P12) o PBMC de donante DRB1\*15, DQB1\*06, PBMC de donante DRB1\*15 o PBMC de donante DQB1\*06 pulsadas con E6<sub>77-91</sub> de VPH 18 (barras sin sombrear) o péptido de E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 (barras sombreadas).

20 La figura 9B es un gráfico que muestra  $IFN-\gamma$  (pg/ml) secretado mediante el clon 20 de fragmento tumoral F15 del paciente 12 tras el cultivo conjunto con PBMC pulsadas con péptido de E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 o células T de mF5 (transducidas para expresar TCR anti-MART-1) cultivadas conjuntamente con células 624 con anticuerpos frente a HLA-DR (barras con líneas horizontales), HLA-DQ (barras con líneas diagonales invertidas), HLA-DP (barras con líneas diagonales directas), anticuerpos pan-clase I (barras negras) o anticuerpos pan-clase II (barras blancas).

25 La figura 10 es un gráfico que muestra  $IFN-\gamma$  (pg/ml) secretado mediante TIL efectores a partir de 24 fragmentos tumorales diferentes (F1-F24) del paciente 4 o TIL de melanoma (control) tras el cultivo conjunto con células dendríticas pulsadas con la combinación de péptidos de E6 de VPH 16 (barras con líneas diagonales invertidas), la combinación de péptidos de E7 de VPH 16 (barras con líneas diagonales directas) o una combinación de péptido gp100 (control) (barras negras). El asterisco (\*) indica TIL administrado por infusión al paciente.

30 La figura 11A es un gráfico que muestra  $IFN-\gamma$  (pg/ml) secretado mediante clones de TIL efectores positivos para CD8 del paciente 4 tras el cultivo conjunto con células dendríticas pulsadas con una combinación de péptidos de E7 de VPH 16 (barras sombreadas) o sin péptido (barras sin sombrear).

35 La figura 11B es un gráfico que muestra  $IFN-\gamma$  (pg/ml) secretado mediante clones de TIL efectores positivos para CD4 del paciente 4 tras el cultivo conjunto con células dendríticas pulsadas con una combinación de péptidos de E7 de VPH 16 (barras sombreadas) o sin péptido (barras sin sombrear).

40 La figura 11C es un gráfico que muestra  $IFN-\gamma$  (pg/ml) secretado mediante clones de TIL efectores positivos para CD8 del paciente 4 tras el cultivo conjunto con células dendríticas pulsadas con una combinación de péptidos de E6 de VPH 16 (barras sombreadas) o sin péptido (barras sin sombrear).

45 La figura 11D es un gráfico que muestra  $IFN-\gamma$  (pg/ml) secretado mediante clones de TIL efectores positivos para CD4 del paciente 4 tras el cultivo conjunto con células dendríticas pulsadas con una combinación de péptidos de E6 de VPH 16 (barras sombreadas) o sin péptido (barras sin sombrear).

Las figuras 12A-B son exploraciones de tomografía computerizada (TC) del tórax del paciente 4 antes (A) y nueve meses después (B) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en A apunta a una lesión cancerosa en el ganglio linfático paraaórtico.

50 Las figuras 12C-D son exploraciones de TC del tórax del paciente 4 antes (C) y nueve meses después (D) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en C apunta a una lesión cancerosa en el ganglio linfático de hilo de pulmón izquierdo.

55 Las figuras 12E-F son exploraciones de TC de la pelvis del paciente 4 antes (E) y nueve meses después (F) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en E apunta a una lesión cancerosa en el ganglio linfático ilíaco común.

60 La figura 13 es un gráfico que muestra  $IFN-\gamma$  (pg/ml) secretado mediante TIL efectores a partir de 24 fragmentos tumorales diferentes del paciente 8 o TIL de melanoma (control) tras el cultivo conjunto con células dendríticas pulsadas con la combinación de péptidos de E6 de VPH 18 (barras con líneas diagonales invertidas), la combinación de péptidos de E7 de VPH 18 (barras con líneas diagonales directas) o una combinación de péptido gp100 (control) (barras negras). El asterisco (\*) indica TIL administrados por infusión al paciente.

65 Las figuras 14A-B son exploraciones de obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) del hígado del paciente 8 antes (A) y dos meses después (B) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en A apunta

a una masa de hígado cancerosa.

5 Las figuras 14C-D son exploraciones de TC del abdomen del paciente 8 antes (C) y dos meses después (D) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en C apunta a una lesión cancerosa en el ganglio linfático retroperitoneal.

Las figuras 14E-F son exploraciones de TC del abdomen del paciente 8 antes (E) y dos meses después (F) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en E apunta a una masa de pared abdominal cancerosa.

10 Las figuras 14G-H son exploraciones de TC de la pelvis del paciente 8 antes (G) y dos meses después (H) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en G apunta a una masa pericólica izquierda cancerosa.

15 La figura 15A es un gráfico que muestra medidas de tamaño de tumor paraaórtico (círculos), hilo izquierdo (cuadrados), hilo derecho ( $\Delta$ ) e ilíaco común (V) (cambio en % desde el nivel inicial) del paciente 4 en puntos de tiempo (número de meses) después de la infusión de VPH-TIL.

20 La figura 15B es un gráfico que muestra medidas de tamaño de tumor de pared abdominal (círculos), paraaórtico (cuadrados), parte izquierda de la pelvis ( $\Delta$ ) y parte derecha del uréter (V) (cambio en % desde el nivel inicial) del paciente 8 en puntos de tiempo (número de meses) después de la infusión de VPH-TIL.

25 Las figuras 16A-D son imágenes de IRM ponderadas por T1, potenciadas por gadolinio, con retardo, del paciente 8. A y C muestran cada uno un tumor en la superficie del hígado antes del tratamiento. B y D muestran que no había ningún tumor presente 11 meses después del tratamiento. Las flechas en A y C indican ubicaciones de los tumores.

30 La figura 17A es un gráfico que muestra el nivel de citocinas en suero (pg/ml) medido en el paciente 4 en puntos de tiempo (número de días) después del tratamiento. Las citocinas medidas incluyen interleucina (IL)-2 (círculos negros), IL-4 (cuadrados), IL-6 ( $\blacktriangle$ ), IL-13 ( $\blacktriangledown$ ), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (rombos) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a) (círculos blancos). Las citocinas que se administraron al paciente están subrayadas.

35 La figura 17B es un gráfico que muestra el nivel de citocinas en suero (pg/ml) medido en el paciente 8 a un número de días después del tratamiento. Las citocinas medidas incluyen IL-2 (círculos negros), IL-5 (cuadrados negros), IL-6 ( $\blacktriangle$ ), IL-8 ( $\blacktriangledown$ ), G-CSF (rombos), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (círculos blancos) y TNF-a (cuadrados blancos). Las citocinas que se administraron al paciente están subrayadas.

40 Las figuras 18A-D son gráficos que muestran la reactividad de TIL que van a administrarse al paciente 4 (A y C) o al paciente 8 (B y D) (barras sombreadas) frente a E6 de VPH, E7 de VPH, o virus de Epstein Barr (VEB) (control) tal como se mide mediante secreción de IFN-gamma (pg/ml) (A y B) y ensayos ELISPOT (C y D). Las barras sin sombrear representan la reactividad de células T reactivas frente a VEB a partir del mismo paciente (control).

45 Las figuras 19A-B son gráficos que muestran recuentos de linfocitos (células/mm<sup>3</sup>) para el paciente 4 (A) y el paciente 8 (B) en diversos puntos de tiempo (días) después de la infusión de TIL. Las células contadas incluyen Células T CD8 (cuadrados), células T CD4 (círculos), células NK ( $\blacktriangle$ ) y células B ( $\blacktriangledown$ ).

50 Las figuras 19C-D son gráficos que muestran células T reactivas frente a VPH detectadas en sangre periférica del paciente 4 (C) o el paciente 8 (D) en diversos puntos de tiempo (meses) después de la infusión de TIL tal como se miden mediante IFN-gamma (pg/ml). Se midió la reactividad frente a E6 de VPH (barras grises), E7 de VPH (barras negras) o gp100 (control) (barras sin sombrear).

55 Las figuras 19E-F son gráficos que muestran la cuantificación de células T reactivas frente a VPH detectadas en sangre periférica del paciente 4 (E) o el paciente 8 (F) en diversos puntos de tiempo (meses) después de la infusión de TIL tal como se mide mediante ELISPOT. Se midió la reactividad frente a E6 de VPH (barras grises), E7 de VPH (barras negras) o gp100 (control) (barras sin sombrear).

60 Las figuras 20A-J son exploraciones de obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) del paciente 13 que tenía un cáncer de amígdalas metastásico antes (A, C, E, G e I) y cuatro meses después (B, D, F, H y J) del tratamiento con terapia celular adoptiva. Las flechas apuntan a múltiples tumores malignos en los pulmones y el hilo de pulmón derecho.

65 Las figuras 21A-B son exploraciones de TC del tórax del paciente 4 antes (A) y 18 meses después (B) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en A apunta a una lesión cancerosa en un ganglio linfático paraaórtico.

Las figuras 21C-D son exploraciones de TC del tórax del paciente 4 antes (C) y 18 meses después (D) del

tratamiento con terapia celular adoptiva. Las flechas en C apuntan a una lesión de hilo izquierdo y a una lesión subcarínica.

5 Las figuras 21E-F son exploraciones de TC del tórax del paciente 4 antes (E) y 18 meses después (F) del tratamiento con terapia celular adoptiva. Las flechas en E apuntan a lesiones hiliares bilaterales.

10 Las figuras 21G-H son exploraciones de TC de la pelvis del paciente 4 antes (G) y 18 meses después (H) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en G apunta a una lesión cancerosa en el ganglio linfático ilíaco común.

Las figuras 22 A-B son exploraciones de TC del abdomen del paciente 8 antes (A) y 11 meses después (B) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en A apunta a una lesión cancerosa en un ganglio linfático retroperitoneal.

15 Las figuras 22C-D son exploraciones de TC del abdomen del paciente 8 antes (C) y 11 meses después (D) del tratamiento con terapia celular adoptiva. Las flechas en C apuntan a una masa de pared abdominal cancerosa y un tumor retroperitoneal.

20 Las figuras 22E-F son exploraciones de TC del abdomen del paciente 8 antes (E) y 11 meses después (F) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en E apunta a una masa paracólica cancerosa.

25 Las figuras 22G-H son exploraciones de TC de la pelvis del paciente 8 antes (G) y 11 meses después (H) del tratamiento con terapia celular adoptiva. La flecha en G apunta a una masa de parte izquierda de la pelvis cancerosa. El triángulo en H apunta a una endoprótesis de uréter.

### **Descripción detallada de la invención**

30 Se ha descubierto que pueden prepararse poblaciones de células T específicas de virus del papiloma humano (VPH) para una variedad de aplicaciones, por ejemplo, terapia celular adoptiva. Los métodos de la invención pueden generar células que son útiles para tratar una variedad de estados, por ejemplo, cáncer.

35 Los métodos de la invención proporcionan numerosas ventajas. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden generar, ventajosamente, células T a partir de cánceres positivos para VPH a una calidad y escala adecuadas para uso clínico. Adicionalmente, los métodos de la invención pueden generar, ventajosamente, células T que reconocen los antígenos de VPH, E6 y E7, que se expresan de manera constitutiva y específica por células cancerosas y no se expresan por células normales. Por tanto, sin limitarse a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que células T generadas mediante los métodos de la invención seleccionan ventajosamente como diana la destrucción de células cancerosas al tiempo que minimizan o eliminan la destrucción de células normales no cancerosas, reduciendo así, por ejemplo, minimizando o eliminando, la toxicidad. Además, dado que una realización de los métodos de la invención incluye quimioterapia no mieloablativa, los métodos de la invención pueden usarse ventajosamente para tratar a pacientes que no serían elegibles para tratamientos que implican irradiación corporal total (TBI) tales como, por ejemplo, pacientes que ya se han sometido a terapia mieloablativa, por ejemplo, radioterapia, antes del tratamiento; pacientes con estados comórbidos; y pacientes con menos de  $2 \times 10^6$  células CD34<sup>+</sup>/kg. Además, los métodos de la invención de 45 tratamiento de cáncer pueden tratar o prevenir, ventajosamente, de manera satisfactoria cánceres positivos para VPH que no responden a otros tipos de tratamiento tales como, por ejemplo, quimioterapia sola, cirugía o radiación.

50 Una realización de la divulgación comprende obtener una muestra de tumor positiva para VPH a partir de un mamífero. La muestra de tumor puede obtenerse a partir de un mamífero de cualquier manera adecuada tal como, por ejemplo, biopsia o resección quirúrgica.

55 En una realización, el método puede comprender someter a prueba la muestra de tumor para detectar infección por VPH. El VPH puede ser cualquier subtipo de VPH. Preferiblemente, el subtipo de VPH es VPH 16 o VPH 18. Las pruebas pueden comprender someter a prueba para detectar la expresión de cualquier proteína (por ejemplo, un antígeno) expresada específicamente por células infectadas por VPH tal como, por ejemplo, una cualquiera o más de E6 de VPH 16, E7 de VPH 16, E6 de VPH 18 y E7 de VPH 18, la expresión de cualquier ARN que codifica para la proteína específica de VPH, o una combinación de los mismos. Las pruebas para detectar infección por VPH pueden llevarse a cabo de cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Las pruebas de VPH a modo de ejemplo pueden incluir una cualquiera o más de genotipado basado en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por transcriptasa inversa (RT) e inmunotransferencias de tipo Western. La muestra de tumor puede ser positiva para infección por cualquier subtipo de VPH tal como, por ejemplo, infección por VPH 16 o VPH 18.

65 Una realización de la invención comprende dividir la muestra de tumor positiva para VPH en múltiples fragmentos. La muestra de tumor puede dividirse en cualquier número adecuado de fragmentos tal como, por

ejemplo, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 o más fragmentos. Preferiblemente, la muestra de tumor se divide en 24 fragmentos. La muestra de tumor puede dividirse de cualquier manera adecuada, por ejemplo, de manera mecánica (disgregando el tumor usando, por ejemplo, un disociador gentleMACS™, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) o de manera enzimática (por ejemplo, colagenasa o ADNasa).

5

Una realización de la invención comprende cultivar por separado los múltiples fragmentos. Con respecto a esto, los fragmentos pueden cultivarse en recipientes independientes, por ejemplo, placas independientes o pocillos independientes de una placa. Los múltiples fragmentos pueden cultivarse de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, los fragmentos pueden cultivarse en un recipiente permeable a gases tal como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0244133. El método comprende cultivar los fragmentos tumorales en presencia de tan sólo una citocina, en el que la citocina es interleucina (IL)-2, IL-7, IL-15 o IL-12. Preferiblemente, la citocina es IL-2. Los fragmentos tumorales pueden cultivarse en cualquier cantidad adecuada de citocina (por ejemplo, desde aproximadamente 30 UI/ml hasta aproximadamente 6.000 UI/ml, de manera preferible aproximadamente 6.000 UI/ml). Preferiblemente, el método comprende cultivar fragmentos tumorales en IL-2 a aproximadamente 6.000 UI/ml.

10

15

El método comprende además obtener células T a partir de los múltiples fragmentos cultivados. El método puede comprender cultivar las células T hasta la confluencia (por ejemplo, aproximadamente  $2 \times 10^6$  linfocitos por ml en una placa de 24 pocillos), por ejemplo, desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 28 días.

20

El método comprende además someter a prueba por separado las células T de los múltiples fragmentos para detectar uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH. El reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico puede someterse a prueba mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, midiendo la liberación de citocinas (por ejemplo, interferón (IFN)- $\gamma$ ) tras el cultivo conjunto con células tumorales positivas para VPH autólogas. Puede considerarse que las células T reconocen tumor positivo para VPH si, por ejemplo, el cultivo conjunto con células tumorales positivas para VPH autólogas da como resultado una liberación de IFN- $\gamma$  que es uno o más de (i) el doble de la cantidad de IFN- $\gamma$  que se mide cuando se cultivan las células T solas (fondo); (ii) al menos aproximadamente 200 pg/ml o más (por ejemplo, 200 pg/ml o más, 300 pg/ml o más, 400 pg/ml o más, 500 pg/ml o más, 600 pg/ml o más, 700 pg/ml o más, 1000 pg/ml o más, 5.000 pg/ml o más, 7.000 pg/ml o más, 10.000 pg/ml o más o 20.000 pg/ml o más); y (iii) se bloquean mediante anticuerpo frente a clase I del CMH en más de aproximadamente el 40%, más de aproximadamente el 50% o más de aproximadamente el 60%.

25

30

El reconocimiento de antígeno de VPH específico puede someterse a prueba mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, midiendo la liberación de citocinas (por ejemplo, IFN- $\gamma$ ) tras el cultivo conjunto con células presentadoras de antígeno negativas para antígeno (por ejemplo, células dendríticas) que se han pulsado con un péptido de un antígeno de VPH. Puede considerarse que las células T reconocen antígeno de VPH si, por ejemplo, la liberación de IFN- $\gamma$  es uno o ambos de (i) el doble de la cantidad de IFN- $\gamma$  que se mide cuando se cultivan las células T con células presentadoras de antígeno que se pulsan con un péptido de control negativo y (ii) al menos aproximadamente 200 pg/ml o más (por ejemplo, 200 pg/ml o más, 300 pg/ml o más, 400 pg/ml o más, 500 pg/ml o más, 600 pg/ml o más, 700 pg/ml o más, 1000 pg/ml o más, 5.000 pg/ml o más, 7.000 pg/ml o más, 10.000 pg/ml o más o 20.000 pg/ml o más) de IFN- $\gamma$  tras el cultivo conjunto con células presentadoras de antígeno negativas para antígeno pulsadas con una baja concentración de péptido de VPH 16 o VPH 18 (por ejemplo, de aproximadamente 0,05 ng/ml a aproximadamente 5 ng/ml, 0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml o 5 ng/ml). Las células T también pueden secretar IFN- $\gamma$  tras el cultivo conjunto con células presentadoras de antígeno negativas para antígeno pulsadas con concentraciones superiores de péptido de VPH.

35

40

45

El antígeno de VPH puede ser cualquier antígeno de VPH. Por ejemplo, el antígeno de VPH puede ser uno cualquiera o más de E6 de VPH 16, E7 de VPH 16, E6 de VPH 18 y E7 de VPH 18. Aunque en algunas realizaciones la población de células T puede reconocer específicamente tan sólo un antígeno de VPH, en algunas realizaciones la población de células T puede reconocer específicamente más de un antígeno de VPH. Con respecto a esto, la población de células T puede comprender múltiples células T que tienen cada una diferentes especificidades de VPH. Por ejemplo, la población de células T puede incluir algunas células T que reconocen específicamente E6 de VPH 16 y otras células T que reconocen específicamente E7 de VPH 16, o la población puede incluir algunas células T que reconocen específicamente E6 de VPH 18 y otras células T que reconocen específicamente E7 de VPH 18.

50

55

El método comprende además seleccionar las células T que muestran uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH. Aunque someter a prueba las células T para detectar uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH puede identificar los cultivos que contienen células T que reconocen VPH, los cultivos que contienen las células T reactivas frente a VPH también pueden contener células T adicionales que son reactivas frente a otros antígenos tumorales distintos de VPH. Por consiguiente, la población de células T seleccionadas puede incluir células T policlonales con múltiples especificidades. En una realización de la

60

65

invención, las pruebas identifican cultivos que sólo contienen células T que reconocen VPH. Con respecto a esto, la población de células T seleccionadas incluye células T con tan sólo especificidad para VPH.

5 El método comprende además expandir el número de células T seleccionadas para producir una población de células T específicas de VPH. La expansión rápida proporciona un aumento en el número de células T específicas de antígeno de al menos aproximadamente 100 veces (o 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 veces o más) a lo largo de un periodo de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 días, de manera preferible aproximadamente 14 días. Más preferiblemente, la expansión rápida proporciona un aumento de al menos aproximadamente 1000 veces (o 1500, 2000, 2500, 3000 veces o más) a lo largo de un periodo de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 días, de manera preferible aproximadamente 14 días. Lo más preferiblemente, la expansión rápida proporciona un aumento de al menos aproximadamente 1000 veces a aproximadamente 3000 veces a lo largo de un periodo de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 días, de manera preferible aproximadamente 14 días.

15 La expansión de los números de células T puede lograrse mediante cualquiera de varios métodos tal como se conocen en la técnica tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense 8.034.334; patente estadounidense 8.383.099; publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0244133; Dudley *et al.*, J. Immunother., 26:332-42 (2003); y Riddell *et al.*, J. Immunol. Methods, 128:189-201 (1990). Por ejemplo, los números de células T pueden expandirse rápidamente usando estimulación con receptor de células T no específico en presencia de linfocitos alimentadores y o bien interleucina-2 (IL-2) o bien interleucina-15 (IL-15), prefiriéndose IL-2. El estímulo de receptor de células T no específico puede incluir aproximadamente 30 ng/ml de OKT3, un anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón (disponible de Ortho-McNeil, Raritan, N.J.). Alternativamente, el número de células T puede expandirse rápidamente mediante estimulación *in vitro* con un antígeno (uno o más, incluyendo porciones antigénicas de los mismos, tales como epítipo(s), o una célula) del cáncer, que puede expresarse opcionalmente a partir de un vector, por ejemplo, 0,3 µM de MART-1:26-35 (27L) o gp100:209-217 (210M), en presencia de un factor de crecimiento de células T, tal como IL-2 o IL-15 300 UI/ml, prefiriéndose IL-2. Los números de células T inducidas *in vitro* pueden expandirse rápidamente mediante nueva estimulación con el/los mismo(s) antígeno(s) del cáncer pulsado(s) en células presentadoras de antígeno. En una realización, los números de células T se expanden en un recipiente permeable a gases tal como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0244133.

20 En una realización de la invención, el método comprende expandir el número de células T usando una o ambas de (i) células alimentadoras alogénicas irradiadas y (ii) células alimentadoras autólogas irradiadas y uno o ambos de (iii) anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón (anticuerpo OKT3) y (iv) un factor de crecimiento de células T, tal como IL-2 o IL-15, prefiriéndose IL-2. El método puede comprender expandir el número de células T usando una o ambas de (i) células alimentadoras alogénicas irradiadas y (ii) células alimentadoras autólogas irradiadas y uno o ambos de (iii) anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón (anticuerpo OKT3) y (iv) interleucina (IL)-2. Preferiblemente, el método comprende expandir el número de células T usando una o ambas de (i) células alimentadoras alogénicas irradiadas y (ii) células alimentadoras autólogas irradiadas y ambos de (iii) anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón (anticuerpo OKT3) y (iv) interleucina (IL)-2. En una realización especialmente preferida, el método comprende expandir el número de células T usando (i) células alimentadoras alogénicas irradiadas, (ii) anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón (anticuerpo OKT3) y (iii) interleucina (IL)-2.

45 En todavía otra realización, el método comprende expandir el número de células T seleccionadas usando uno o ambos de (i) anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón (anticuerpo OKT3) y (ii) interleucina (IL)-2 para producir una población de células T específicas de VPH, opcionalmente en combinación con una o ambas de células alimentadoras alogénicas irradiadas y células alimentadoras autólogas irradiadas. Con respecto a esto, una realización de la invención proporciona un método de preparación de una población de células T específicas de VPH, comprendiendo el método: dividir una muestra de tumor positiva para VPH en múltiples fragmentos; cultivar por separado los múltiples fragmentos en presencia de tan sólo una citocina, en el que la citocina es interleucina (IL)-2, IL-7, IL-15 o IL-12; obtener células T a partir de los múltiples fragmentos cultivados; someter a prueba por separado las células T de los múltiples fragmentos para detectar uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; seleccionar las células T que muestran uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; y expandir el número de células T seleccionadas usando uno o ambos de (i) anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón (anticuerpo OKT3) y (ii) interleucina (IL)-2 para producir una población de células T específicas de VPH. La división de la muestra de tumor, el cultivo de los fragmentos tumorales, la obtención de células T, las pruebas de las células T, la selección de las células T y la expansión de los números de células T seleccionadas pueden llevarse a cabo tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención.

60 La población de números expandidos de células T producida mediante los métodos de la invención puede reconocer específicamente células positivas para VPH, por ejemplo, células cancerosas positivas para VPH. Las células que se reconocen mediante las células T pueden ser positivas para cualquier subtipo de VPH tal como, por ejemplo, VPH 16 o VPH 18. Alternativa o adicionalmente, la población de células T producida mediante los métodos de la invención puede reconocer específicamente cualquier antígeno de VPH tal como, por ejemplo,

uno cualquiera o más de E6 de VPH 16, E7 de VPH 16, E6 de VPH 18 y E7 de VPH 18. Aunque en algunas realizaciones la población de células T puede reconocer específicamente tan sólo un antígeno de VPH, en algunas realizaciones la población de células T puede reconocer específicamente más de un antígeno de VPH. Con respecto a esto, la población de números expandidos de células T puede comprender múltiples células T que tienen cada una diferentes especificidades de VPH. Por ejemplo, la población de números expandidos de células T puede incluir algunas células T que reconocen específicamente E6 de VPH 16 y otras células T que reconocen específicamente E7 de VPH 16, o la población puede incluir algunas células T que reconocen específicamente E6 de VPH 18 y otras células T que reconocen específicamente E7 de VPH 18. La capacidad de la población de números expandidos de células T producida mediante los métodos de la invención para reconocer específicamente células positivas para VPH y para reconocer específicamente un antígeno de VPH puede medirse tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención.

La población de células T producida mediante los métodos de la invención puede ser útil para tratar o prevenir estados asociados con VPH, por ejemplo, cáncer. Por consiguiente, otro aspecto de la invención proporciona una población de células T específicas de VPH para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer en un mamífero, comprendiendo el método preparar una población de células T específicas de VPH según cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento y administrar la población de células T al mamífero en una cantidad eficaz para tratar o prevenir cáncer en el mamífero.

La invención proporciona una población de células T específicas de VPH preparada según un método que comprende: dividir una muestra de tumor positiva para VPH en múltiples fragmentos; cultivar por separado los múltiples fragmentos en presencia de tan sólo una citocina, en la que la citocina es IL-2; obtener células T a partir de los múltiples fragmentos cultivados; someter a prueba por separado las células T de los múltiples fragmentos para detectar uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; seleccionar las células T que muestran uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; expandir el número de células T seleccionadas para producir una población de células T específicas de VPH para terapia celular adoptiva; para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer en un mamífero, opcionalmente en la que el cáncer es un cáncer positivo para VPH.

En una realización de la invención la población de células T para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer en un mamífero comprende además administrar al mamífero quimioterapia no mieloablativa que produce linfopenia. La quimioterapia no mieloablativa que produce linfopenia puede ser cualquier terapia adecuada de este tipo, que puede administrarse por cualquier vía adecuada. La quimioterapia no mieloablativa que produce linfopenia puede comprender la administración de ciclofosfamida y fludarabina, particularmente si el cáncer es un cáncer positivo para VPH, que puede ser metastásico. Una vía preferida de administración de ciclofosfamida y fludarabina es por vía intravenosa. Asimismo, puede administrarse cualquier dosis adecuada de ciclofosfamida y fludarabina. Preferiblemente, se administran aproximadamente 60 mg/kg de ciclofosfamida durante dos días después de lo cual se administran aproximadamente 25 mg/m<sup>2</sup> de fludarabina durante cinco días, particularmente si el cáncer es un cáncer positivo para VPH. En una realización de la invención, la quimioterapia no mieloablativa que produce linfopenia se administra antes de administrar las células T.

Una realización de la invención comprende, después de administrar la quimioterapia no mieloablativa que produce linfopenia, administrar al mamífero la población de células T específicas de VPH preparada mediante cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento.

Las células T pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada tal como se conoce en la técnica. Preferiblemente, las células T se administran como una infusión intraarterial o intravenosa, que preferiblemente dura de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos. Otros ejemplos de vías de administración incluyen intraperitoneal, intratecal e intralinfática.

Asimismo, puede administrarse cualquier dosis adecuada de células T. Preferiblemente, se administran desde aproximadamente  $1,0 \times 10^{10}$  células T hasta aproximadamente  $13,7 \times 10^{10}$  células T, con un promedio de aproximadamente  $5,0 \times 10^{10}$  células T, particularmente si el cáncer es un cáncer positivo para VPH. Alternativamente, se administran desde aproximadamente  $1,2 \times 10^{10}$  hasta aproximadamente  $4,3 \times 10^{10}$  células T.

En una realización de la invención, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede comprender además combinar la población de células T específicas de VPH con un portador farmacéuticamente aceptable. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier portador farmacéuticamente aceptable que es adecuado para terapia celular adoptiva. Por ejemplo, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir cualquier portador isotónico tal como, por ejemplo, solución salina normal (aproximadamente el 0,90% p/v de NaCl en agua, NaCl a aproximadamente 300 mOsm/l en agua, o aproximadamente 9,0 g de NaCl por litro de agua), disolución de electrolito NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL), dextrosa a aproximadamente el 5% en agua, o solución de Ringer lactato. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable se complementa con albúmina sérica humana.

Una realización de la invención comprende enriquecer células T cultivadas en cuanto a células T CD8<sup>+</sup> antes de la expansión rápida de las células. Tras el cultivo de las células T, las células T se empobrecen en cuanto a células CD4<sup>+</sup> y se enriquecen en cuanto a células CD8<sup>+</sup> usando, por ejemplo, una separación con microperlas de CD8 (por ejemplo, usando un sistema de microperlas de CD8 CliniMACS<sup>plus</sup> (Miltenyi Biotec)). Sin limitarse a ninguna teoría particular, se cree que el enriquecimiento en CD8<sup>+</sup> de algunos cultivos de células T revela un reconocimiento tumoral *in vitro* que puede no ser evidente en el cultivo a granel, y un reconocimiento *in vitro* mejorado de tumor en otros cultivos. Adicionalmente, se cree que las células T CD8<sup>+</sup> enriquecidas se comportan de manera más fiable y predecible en expansiones rápidas a escala clínica que las células T a granel.

Una realización de la invención comprende enriquecer células T cultivadas en cuanto a células T CD4<sup>+</sup> antes de la expansión rápida de las células. Tras el cultivo de las células T, las células T se empobrecen en cuanto a células CD8<sup>+</sup> y se enriquecen en cuanto a células CD4<sup>+</sup> usando, por ejemplo, una separación con microperlas de CD4 (por ejemplo, usando un sistema de microperlas de CD8 CliniMACS<sup>plus</sup> (Miltenyi Biotec)).

En una realización, la invención proporciona una población de células T específicas de VPH para su uso tal como se describe en el presente documento, en la que se administra un factor de crecimiento de células T que fomenta el crecimiento y la activación de las células T autólogas al mamífero o bien de manera concomitante con las células T autólogas o bien de manera posterior a las células T autólogas. El factor de crecimiento de células T puede ser cualquier factor de crecimiento adecuado que fomenta el crecimiento y la activación de las células T autólogas. Los ejemplos de factores de crecimiento de células T adecuados incluyen interleucina (IL)-2, IL-7, IL-15 e IL-12, que pueden usarse solas o en diversas combinaciones, tales como IL-2 e IL-7, IL-2 e IL-15, IL-7 e IL-15, IL-2, IL-7 e IL-15, IL-12 e IL-7, IL-12 e IL-15 o IL-12 e IL-2. IL-12 es un factor de crecimiento de células T preferido.

En una realización, la invención proporciona una población de células T específicas de VPH para su uso tal como se describe en el presente documento, en la que las células T se modifican para expresar un factor de crecimiento de células T que fomenta el crecimiento y la activación de las células T. Los factores de crecimiento de células T adecuados incluyen, por ejemplo, cualquiera de los descritos anteriormente. En la técnica se conocen métodos de modificación adecuados. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2012; y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994. De manera deseable, las células T autólogas modificadas expresan el factor de crecimiento de células T a niveles altos. Secuencias que codifican para factor de crecimiento de células T, tales como las de IL-12, están fácilmente disponibles en la técnica, al igual que promotores, cuya unión operativa a una secuencia que codifica para factor de crecimiento de células T fomenta la expresión a alto nivel.

El factor de crecimiento de células T puede administrarse mediante cualquier vía adecuada. Si se administra más de un factor de crecimiento de células T, pueden administrarse de manera simultánea o secuencial, en cualquier orden, y mediante la misma vía o vías diferentes. Preferiblemente, el factor de crecimiento de células T, tal como IL-2, se administra por vía intravenosa como inyección en bolo. La dosificación del factor de crecimiento de células T puede elegirse basándose en tolerancia de paciente. Por ejemplo, el factor de crecimiento de células T puede administrarse hasta que se producen uno o más acontecimientos adversos limitantes. De manera deseable, la dosificación del factor de crecimiento de células T, tal como IL-2, es lo que los expertos habituales en la técnica consideran que es alta. Preferiblemente, se administra una dosis de aproximadamente 720.000 UI/kg de IL-2 tres veces al día hasta la tolerancia, particularmente cuando el cáncer es un cáncer positivo para VPH. Preferiblemente, se administran de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 dosis de IL-2, con un promedio de aproximadamente 9 dosis.

En una realización, las células T autólogas pueden modificarse para expresar un receptor de células T (TCR) que tiene especificidad antigénica por un antígeno de VPH, por ejemplo, cualquiera de los antígenos de VPH descritos en el presente documento. En la técnica se conocen métodos adecuados de modificación. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook y Ausubel, citado anteriormente. Por ejemplo, pueden transducirse las células T para expresar un receptor de células T (TCR) que tiene especificidad antigénica por un antígeno de VPH usando técnicas de transducción descritas en Heemskerk *et al.* *Hum Gene Ther.* 19:496-510 (2008) y Johnson *et al.* *Blood* 114:535-46 (2009).

Con respecto a los métodos de la invención, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rhabdomyosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer del ano, el canal anal o el ano, cáncer del ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer del cuello, la vesícula biliar o la pleura, cáncer de la nariz, la cavidad nasal o el oído medio, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de la vagina, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de la orofaringe, cáncer de ovarios, cáncer del pene, cáncer pancreático, cáncer de

peritoneo, epiplón y mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer del intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer del útero, cáncer de uretra y cáncer de la vejiga urinaria. Un cáncer preferido es cáncer es cáncer del cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva o pene. Un cáncer particularmente

5

preferido es cáncer positivo para VPH. El cáncer positivo para VPH puede ser, por ejemplo, cáncer positivo para VPH 16 o positivo para VPH 18. Aunque los cánceres más habitualmente asociados con infección por VPH incluyen cáncer del cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva, y pene, los métodos de la invención pueden usarse para tratar cualquier cáncer positivo para VPH, incluyendo los que se producen en otras zonas anatómicas.

10

15

Tal como se usa en el presente documento, el término “mamífero” se refiere a cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos del orden *Rodentia*, tal como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden *Lagomorpha*, tales como conejos. Se prefiere que los mamíferos sean del orden *Carnivora*, incluyendo felinos (gatos) y caninos (perros). Se prefiere más que los mamíferos sean del orden *Artiodactyla*, incluyendo bovinos (vacas) y porcinos (cerdos) o del orden *Perssodactyla*, incluyendo equinos (caballos). Lo más preferido es que los mamíferos sean del orden de primates, cébidos o simoides (monos) o del orden *Anthropoids* (seres humanos y simios). Un mamífero especialmente preferido es el ser humano.

Los términos “tratar” y “prevenir” así como palabras que se deriven de los mismos, tal como se usan en el presente documento, no implican necesariamente un tratamiento o prevención del 100% o completo. En vez de eso, hay diversos grados de tratamiento o prevención de los cuales un experto habitual en la técnica reconoce que tienen un posible beneficio o efecto terapéutico. Con respecto a esto, los métodos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionado por el método de la invención puede incluir tratamiento o prevención de uno o más estados o síntomas de la enfermedad, por ejemplo, cáncer, que está tratándose o previniéndose. Por ejemplo, el tratamiento o la prevención proporcionado por el método de la invención puede incluir fomentar la regresión de un tumor. Además, para fines en el presente documento, la “prevención” puede abarcar retrasar la aparición de la enfermedad o un síntoma o estado de la misma.

20

25

### 30 EJEMPLO 1

Este ejemplo demuestra un método de preparación de linfocitos de infiltración tumoral (TIL) positivos para VPH para terapia celular adoptiva.

35

Se introdujeron pacientes en protocolos clínicos y firmaron consentimientos informados que se aprobaron por la junta de revisión institucional del Instituto nacional del cáncer antes de la resección de tumores. Se escindieron tumores a partir de los pacientes. Se sometieron a prueba los tumores para detectar la expresión de E6 de VPH 16, E7 de VPH 16, E6 de VPH 18 y E7 de VPH 18 usando genotipado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por transcriptasa inversa (RT).

40

Se establecieron múltiples (24) cultivos independientes de TIL positivos para E6 de VPH 16, positivos para E7 de VPH, positivos para E6 de VPH 18 y positivos para E7 de VPH usando productos de digestión enzimática y fragmentos tumorales (1-2 mm<sup>3</sup>) proporcionados mediante disección cortante. Se generaron TIL a partir de productos de digestión de tumor cultivando suspensiones de células individuales (5 x 10<sup>5</sup>/ml) obtenidas mediante digestión enzimática durante la noche de fragmentos tumorales en medios que contenían colagenasa, hialuronidasa y ADNasa. Se iniciaron cultivos de fragmentos tumorales y productos de digestión en pocillos de 2 ml de medio completo (CM) e IL-2 (6000 UI/ml, Chiron Corp., Emeryville, CA) en una incubadora humidificada a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. CM incluía RPMI1640 con glutamina, más suero AB humano al 10%, HEPES 25 mM, gentamicina 10 µg/ml y 2-mercaptoetanol 5,5 x 10<sup>-5</sup> M. Cinco días tras el inicio, se aspiró la mitad de los medios a partir de los pocillos y se sustituyó por CM e IL-2 nuevos, y se sustituyeron los medios cada dos a tres días después de eso según se necesitó. En estas condiciones, en primer lugar los linfocitos producirán la lisis de células adherentes en el pocillo y después comenzarán a multiplicarse y crecer.

45

50

Los cultivos de TIL lograron el crecimiento confluyente del pocillo de 2 ml original y eliminaron las células tumorales adherentes, normalmente a aproximadamente 12-28 días tras el inicio. En la práctica, esto fue aproximadamente 4 x 10<sup>6</sup> linfocitos a partir de cada pocillo de producto de digestión o fragmento tumoral original. Combinando todos los pocillos en una única placa de 24 pocillos, se obtuvieron aproximadamente 5 x 10<sup>7</sup> células de TIL.

55

Cuando los cultivos diseñados para la generación de TIL se expandieron hasta la confluencia en pocillos de 2 ml, se sometieron a prueba para detectar reactividad específica para VPH. Dado que los TIL se establecieron en grandes números (normalmente grupos de 24 por tumor) no era viable contar cada cultivo de TIL de manera individual. El ensayo de especificidad de TIL mide la actividad por volumen en vez de la actividad por célula. Se mezcló cada pocillo exhaustivamente y se lavaron cien microlitros de linfocitos (estimación de 1x10<sup>5</sup> células) y se cultivaron conjuntamente durante la noche con producto de digestión de tumor autólogo o células dendríticas (DC) derivadas de monocitos autólogos pulsadas con combinaciones de péptidos MACS PEPTIVATOR de E6 y

60

65

E7 de VPH 16 y VPH 18. Las combinaciones de péptidos incluyeron péptidos de 15 meros con solapamientos de 11 aminoácidos que cubrían la secuencia completa de E6 o E7 (VPH 16 o VPH 18). Las combinaciones de péptidos eran puras en más del 75% y tenían un bajo contenido en endotoxina. Después se midió la liberación de IFN- $\gamma$  con ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los resultados se muestran en la tabla A.

5

TABLA A

Número de paciente	Sitio primario del cáncer	Tipo de VPH	Reactividad de péptido (número de fragmentos tumorales) <sup>1</sup>	Reactividad de producto de digestión de tumor (número de fragmentos tumorales) <sup>2</sup>
1	cuello uterino	VPH-18	E7 (22)	Sí (4)
2	amígdalas	VPH-16	E7 (5)	-
3	cuello uterino	VPH-18	E6 (7), E7 (19)	Sí (3)
4	cuello uterino	VPH-16	E6 (18), E7 (23)	No
5	cuello uterino	VPH-16	E6 (1)	No
6	desconocido (cuello)	VPH-16	E6 (23), E7 (22)	-
7	cuello uterino	VPH-18	E6 (1), E7 (5)	-
8	cuello uterino	VPH-18	E7 (3)	-
9	cuello uterino	VPH-18	ninguna	No
10	desconocido (pelvis)	VPH-16	E6 (1)	Sí (1)
11	cuello uterino	VPH-18	ninguna	No
12	cuello uterino	VPH-18	E6, E7	-
13	ano	VPH-16	ninguna	-
14	ano	VPH-16	E6	-
15	cuello uterino	VPH-16	E6, E7	-

<sup>1</sup>Definido como al menos un fragmento tumoral con > 200 pg/ml y el doble del fondo (combinación de péptidos de control negativo).  
<sup>2</sup>Definido como IFN- $\gamma$  > 200 pg/ml, el doble del fondo (TIL solos) y >50% de bloqueo con anticuerpo de clase I del CMH W6/32.  
 "-" indica no sometido a prueba.

Se realizó la expansión rápida de los números de TIL reactivos frente a VPH usando el protocolo de expansión rápida (REP) tal como se describió anteriormente (Dudley *et al.*, J. Immunother., 26:332-42 (2003) y Riddell *et al.*, J. Immunol. Methods, 128:189-201 (1990)). En resumen, se cultivaron células de TIL en matraces G-REX permeables a gases con un exceso de 200 veces de células "alimentadoras" mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas (40 Gy) en medio completo (CM) con anticuerpo anti-CD3 30 ng/ml e IL-2 6000 UI/ml. Se intercambió la mitad de los medios en el día 5 usando CM con IL-2 6000 UI/ml y se dividieron las células según se necesitó después de eso. Los TIL se expandieron en promedio más de 3000 veces.

## EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra la reactividad de los TIL del paciente 1.

Se generaron TIL tal como se describió en el ejemplo 1 a partir de 22 fragmentos tumorales diferentes (F1-F22) del paciente 1. Se cultivaron conjuntamente los TIL del paciente 1 o TIL de melanoma (control) con células dendríticas pulsadas con la combinación de péptidos de E7 de VPH 18 o una combinación de péptido gp100 (control) y se midió IFN- $\gamma$ . Los resultados se muestran en las figuras 1A-1B. Tal como se muestra en las figuras 1A-1B, los TIL a partir del fragmento tumoral 22 del paciente 1 reconocieron una línea tumoral autóloga pero no péptidos de E7 de VPH 18.

Se cultivaron conjuntamente los TIL a partir de los fragmentos tumorales F16, F17 o F22 del paciente 1 o células administradas al paciente para el tratamiento ("bolsas de infusión") con tumor autólogo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de tejido autólogo, células tumorales coincidentes en todos los loci de clase I, células HeLa (de coincidencia errónea con HLA) o células CaSki (de coincidencia errónea con HLA). Se midió IFN- $\gamma$ . Los resultados se muestran en la figura 2A. Tal como se muestra en la figura 2A, los TIL a partir de los fragmentos tumorales F16 y F22 mostraron reconocimiento de tumor autólogo.

Se transfectaron células tumorales autólogas con ARN de silenciamiento frente a HLA-A, HLA-B, HLA-C, o ARN irrelevante (sin direccionamiento) y se cultivaron conjuntamente con TIL del paciente 1. Se midió IFN- $\gamma$ . Los resultados se muestran en la figura 2B. Tal como se muestra en la figura 2B, el reconocimiento de TIL del paciente 1 disminuyó mediante silenciamiento de HLA-A.

Se cultivaron células efectoras/diana (TIL del paciente 1/células tumorales autólogas; DMF5/células 624; o F15 del paciente 12 (P12)/VPH18E6<sub>121-135</sub>) solas o se cultivaron conjuntamente sin anticuerpo, con anticuerpo anti-HLA-A2 o anticuerpo anti-clase II. Las células DMF5 son células T transducidas para expresar un TCR frente a

MART-1 restringido a clase I del CMH. Los resultados se muestran en la figura 2C. Tal como se muestra en la figura 2C, el reconocimiento de TIL del paciente 1 no se inhibió mediante bloqueo de HLA-A\*02, lo cual sugirió un reconocimiento tumoral restringido a HLA-A\*01. El haplotipo del paciente 1 era HLA-A\*01, HLA-A\*02.

5 Se cultivaron conjuntamente TIL a partir del fragmento tumoral F16 o F22 del paciente 1; células administradas al paciente para tratamiento ("bolsas de infusión"); TIL de melanoma 1, 2 ó 3 (TIL cultivados a partir de tumores de melanoma); TCR de mE7 (células T a partir de PBMC que se transdujeron para expresar un TCR frente a E7<sub>11-19</sub> de VPH 16); o TIL de F15 (TIL a partir de otro paciente que eran reactivos frente a E6<sub>121-135</sub> de VPH 18, restringidos a clase II, y por tanto podían bloquearse con HB145) con una combinación de péptido gp100, anticuerpo OKT3 o DC pulsadas con una combinación de péptidos de E7 de VPH 18, combinación de péptidos de E7 de VPH 18 y W6/32, E7<sub>11-19</sub> de VPH 16, E7<sub>11-19</sub> de VPH 16 y W6/32, E7<sub>11-19</sub> de VPH 16 y HB145, E6<sub>121-135</sub> de VPH 18, E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 y W6/32, o E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 y HB 145. Los resultados se muestran en la figura 3. Tal como se muestra en la figura 3, TIL a partir del fragmento tumoral F16 del paciente 1 mostraron reconocimiento restringido a clase I de péptidos de E7 de VPH 18.

#### 15 EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra la clonación de TIL a partir del fragmento tumoral 16 del paciente 1 para aislar células T positivas para CD8 reactivas frente a E7 de VPH 18.

20 Se cargaron DC con E7 de VPH 18 y se cultivaron conjuntamente con TIL a partir del fragmento tumoral 16 (F16) del paciente 1. Se clasificaron los TIL para detectar células positivas para 4-1BB usando la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se cultivaron las células clasificadas en placas de 96 pocillos con dos células por pocillo. Se examinaron los clones para detectar reactividad tumoral frente a una combinación de péptido gp100 o una combinación de péptidos de E7 de VPH 18. Los resultados se muestran en las figuras 4A y 4B. Tal como se muestra en las figuras 4A y 4B, la clonación de células T positivas para CD8 a partir del fragmento tumoral F16 usando clasificación FACS basada en 4-1BB dio como resultado el aislamiento de dos clones (12 y 21) con reactividad frente a combinación de péptidos de E7.

#### 30 EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra la reactividad de los TIL generados en el ejemplo 1 del paciente 12.

35 Se generaron TIL tal como se describió en el ejemplo 1 a partir de 36 fragmentos tumorales diferentes (F1-F36) del paciente 12. Se cultivaron conjuntamente los TIL del paciente 12 o TIL de melanoma (control) con células dendríticas pulsadas con la combinación de péptidos de E6 de VPH 18, la combinación de péptidos de E7 de VPH 18 o una combinación de péptido gp100 (control) y se midió IFN- $\gamma$ . Los resultados se muestran en la figura 5. Tal como se muestra en la figura 5, los TIL a partir de los fragmentos tumorales F1 y F15 del paciente 12 mostraron los niveles más altos de producción de IFN- $\gamma$ .

40 Se transdujeron DC autólogas con un vector lentiviral de E6 de VPH 18 o un vector lentiviral de proteína verde fluorescente (GFP). Se pulsaron otras células autólogas con una combinación de péptido gp100 o una combinación de péptidos de E6 de VPH 18. Se cultivaron conjuntamente células transducidas con TIL a partir del fragmento tumoral F1 del paciente 12, o TIL de melanoma 1, 2 ó 3. Los resultados se muestran en la figura 6. Tal como se muestra en la figura 6, los TIL generados a partir del fragmento tumoral F1 del paciente 12 reconocieron DC transducidas con E6 de VPH 18, lo que sugiere que los TIL seleccionan como diana un antígeno presentado y procesado de manera natural.

#### 50 EJEMPLO 5

Este ejemplo demuestra la reactividad de clones de TIL a partir de los fragmentos tumorales 1 y 15 del paciente 12 para aislar células T positivas para CD8 reactivas frente a E6 de VPH 18.

55 Se cargaron DC con E6 de VPH 18 y se cultivaron conjuntamente con TIL a partir de los fragmentos tumorales 1 y 15 del paciente 12. Se clasificaron los TIL para detectar células positivas para 4-1BB usando FACS. Se clasificaron adicionalmente las células en poblaciones positivas para CD4 y positivas para CD8. Se cultivaron las células clasificadas en placas de 96 pocillos con dos células por pocillo. Se examinaron los clones para detectar reactividad tumoral frente a una combinación de péptidos de E6 de VPH 18. De 480 pocillos de células positivas para CD4 a partir de F1, 14 crecieron y 2 fueron reactivos. De 912 pocillos de células positivas para CD8 a partir de F1, 33 crecieron y ninguno fue reactivo. De 470 pocillos de células positivas para CD4 a partir de F15, 163 crecieron y 32 fueron reactivos. De 960 pocillos de células positivas para CD8 a partir de F15, 41 crecieron y ninguno fue reactivo.

65 También se sometieron a prueba las células clasificadas para CD4 para detectar la reactividad tal como se mide mediante secreción de factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$  tras el cultivo conjunto con una combinación de péptidos de E6 de VPH 18 (una combinación que abarcaba toda la proteína E6), ningún péptido,

subcombinaciones de la proteína E6 de VPH 18, o péptidos 30-37 de la combinación de péptidos de E6 de VPH 18. Cada subcombinación contenía una porción de la combinación de péptidos inicial. Los resultados se muestran en las figuras 7A-7C. Tal como se muestra en las figuras 7A-7C, los clones 3, 12 y 20 del fragmento tumoral F1 del paciente 12 eran reactivos frente a E6 de VPH 18. Los clones de células T positivas para CD4 que se generaron reconocieron dos péptidos de 15 meros secuenciales con un solapamiento de 11 aminoácidos. Los péptidos compartían el epítipo E6<sub>125-135</sub> de VPH 18.

EJEMPLO 6

Este ejemplo demuestra que los clones generados a partir del fragmento tumoral F15 del paciente 12 reconocen E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 de una manera restringida a HLA-DRB1\*15.

Se cultivaron conjuntamente los clones 3, 12 y 20 con PBMC de donante con los haplotipos expuestos en la tabla B. Se pulsaron las PBMC de donante con E6<sub>121-135</sub> de VPH 18.

TABLA B

	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
Donante 1	13:02	15:01	06	06	04:02	03:01
Donante 2	03:01	04:01	02	03:02	04:02	02:01
Donante 3	13:01	15	06	06	02:01	03:01
Donante 4	03	07:01	02:01	02:02	04:01	01:01
Donante 5	01:02	14	05:01	05:03	04:01	0501
Donante 6	01:01	13:02	05:01	06	5:02	9:01
Paciente 12	03	15:01	02	06:02	04:01	09

Se midió la secreción de TNF $\alpha$ . Los resultados se muestran en las figuras 8A-8C. Tal como se muestra en las figuras 8A-8C, los clones generados a partir del fragmento F15 del paciente 12 reconocieron E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 pulsado en PBMC que coincidían tanto en HLA-DRB1\*15 como en HLA-DQB1\*06, pero no PBMC que sólo coincidían en HLA-DQB1\*06, lo que sugiere restricción a HLA-DRB1\*15. La frecuencia de alelo de fenotipo de HLA-DRB1\*15 es del 25 por ciento.

Se cultivaron conjuntamente los TIL a partir del clon 3 del fragmento tumoral F15 del paciente 12 con PBMC autólogas o PBMC de donante pulsadas con E6<sub>77-91</sub> de VPH 18 o E6<sub>121-135</sub> de VPH 18. Los resultados se muestran en la figura 9A. Tal como se muestra en la figura 9A, los TIL a partir del clon 3 del fragmento tumoral F15 del paciente 12 reconocieron PBMC que sólo coincidían en DRB1\*15 pero no sólo en DRB1\*06.

Se cultivaron conjuntamente los TIL a partir del clon 20 del fragmento tumoral F15 del paciente 12 con E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 en presencia de anticuerpos frente a HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, anticuerpos pan-clase I o anticuerpos pan-clase II. Los anticuerpos pan-clase I y II bloquean la unión de células T a moléculas de clase I o clase II del CMH, respectivamente. Los resultados se muestran en la figura 9B. Tal como se muestra en la figura 9B, el reconocimiento de péptido relacionado mediante TIL a partir del clon 20 del fragmento tumoral F15 del paciente 12 se inhibió mediante anticuerpos bloqueantes frente a HLA-DR. Tal como se muestra en las figuras 9A y 9B, los TIL a partir del fragmento tumoral F15 del paciente 12 reconocen E6<sub>121-135</sub> de VPH 18 de una manera restringida a DRB1\*15.

EJEMPLO 7

Este ejemplo demuestra la reactividad de TIL a partir de los pacientes 4 y 8.

Se generaron TIL tal como se describió en el ejemplo 1 a partir de 24 fragmentos tumorales diferentes (F1-F24) del paciente 4 o el paciente 8. Se cultivaron conjuntamente los TIL del paciente 4 o TIL de melanoma (control) con DC autólogas pulsadas con la combinación de péptidos de E6 de VPH 16, la combinación de péptidos de E7 de VPH 16 o una combinación de péptido gp100 (control) y se midió IFN- $\gamma$ . Los resultados se muestran en la figura 10. Tal como se muestra en la figura 10, los TIL a partir de los fragmentos tumorales F4, F5, F14, F19 y F22 se encontraban entre los fragmentos tumorales que mostraron reactividad frente a DC autólogas pulsadas con combinaciones de péptidos de E6 y E7 de VPH 16.

Se cultivaron conjuntamente los TIL del paciente 8 o TIL de melanoma (control) con DC autólogas pulsadas con la combinación de péptidos de E6 de VPH 18, la combinación de péptidos de E7 de VPH 18 o una combinación de péptido gp100 (control) y se midió IFN- $\gamma$ . Los resultados se muestran en la figura 13. Tal como se muestra en la figura 13, se generaron TIL que mostraron reactividad frente a DC autólogas pulsadas con la combinación de péptidos de E7 de VPH 18.

EJEMPLO 8

Este ejemplo demuestra la clonación de TIL a partir de los fragmentos tumorales del paciente 4 para aislar células T positivas para CD4 y CD8 reactivas frente a VPH.

- 5 Se cargaron DC con E6 de VPH 16 o E7 de VPH 16 y se cultivaron conjuntamente con TIL a partir de los fragmentos tumorales del paciente 4. Los TIL reactivos frente a E6 de VPH 16 y E7 de VPH 16 se clasificaron por separado para detectar células positivas para 4-1BB usando FACS. Se expandieron los números de células tal como se describió en el ejemplo 1. Se clasificaron adicionalmente las células en células positivas para 4-1BB mediante FACS. Se cultivaron las células clasificadas en placas de 96 pocillos con dos células por pocillo. Se  
10 clasificaron adicionalmente las células en poblaciones positivas para CD4 y positivas para CD8. Se examinaron los clones para detectar reactividad tumoral frente a una combinación de péptidos de E6 o E7 de VPH 16.

Los resultados se muestran en las figuras 11A-11D. Tal como se muestra en las figuras 11A-11D, se generaron clones de células T positivas para CD8 y positivas para CD4 con reactividad frente a E6 y E7 de VPH 16.

15 EJEMPLO 9

Este ejemplo demuestra que la terapia celular adoptiva usando células T anti-VPH trata el cáncer.

- 20 Los criterios de inclusión para el estudio incluyeron (1) cáncer de cuello uterino con recidiva/que no responde al tratamiento o metastásico o cáncer positivo para VPH de alto riesgo de cualquier sitio y (2) quimioterapia previa con platino, incluyendo quimiorradiación.

- 25 Se resecaron tumores a partir de los pacientes. Se obtuvieron TIL a partir del tumor, se hicieron crecer, se expandieron los números de TIL y se examinaron los números expandidos de TIL para detectar la reactividad frente a VPH tal como se describió en el ejemplo 1.

Los pacientes recibieron un régimen preparativo no mieloablativo, que producía linfopenia, de ciclofosfamida (60 mg/kg/día) por vía intravenosa (i.v.) en los días -7 y -6 y fludarabina (25 mg/m<sup>2</sup>/día) i.v. en los días -5 a -1.

- 30 Se administraron TIL por vía intravenosa a los pacientes en el día 0. Se administró por vía intravenosa una dosis alta de aldesleukina (interleucina (IL)-2) (720.000 UI/kg) a los pacientes en los días 0 a 4.

- 35 Se sometieron los pacientes a una evaluación completa del tumor de 4 a 6 semanas después de completarse el régimen de tratamiento inicial (definido como el último día de administración de aldesleukina). Si el paciente tenía enfermedad estable o contracción del tumor, se realizaron evaluaciones completas repetidas mensualmente durante aproximadamente 3-4 meses, y después cada 3-4 meses hasta que se cumplieron los criterios para salir del estudio. Todas las lesiones medibles hasta un máximo de 10 lesiones representativas de todos los órganos implicados se identificaron como lesiones diana y se registraron y midieron en el nivel inicial. Todas las demás  
40 lesiones (o sitios de enfermedad) se identificaron como lesiones no diana y también se registraron en el nivel inicial. Se evaluaron las lesiones según las directrices de criterios de evaluación de respuestas en tumores sólidos (RECIST) (versión 1.0) tal como se expone en la tabla C (lesiones diana) y la tabla D (lesiones no diana).

45 TABLA C

Respuesta completa (CR)	Desaparición de todas las lesiones diana
Respuesta parcial (PR)	Una disminución de al menos el 30% en la suma del diámetro más largo (LD) de lesiones diana tomando como referencia la suma de LD de nivel inicial.
Progresión (PD)	Un aumento de al menos el 20% en la suma de LD de lesiones diana tomando como referencia la suma de LD más pequeña registrada desde que comenzó el tratamiento o la aparición de una o más nuevas lesiones.
Enfermedad estable (SD)	Ni contracción suficiente como para calificar de PR ni aumento suficiente como para calificar de PD tomando como referencias la suma de LD más pequeña.

TABLA D

Respuesta completa (CR)	Desaparición de todas las lesiones no diana y normalización del nivel de marcador tumoral
Respuesta incompleta	Persistencia de una o más lesiones no diana
Progresión (PD)	Aparición de una o más nuevas lesiones. Progresión inequívoca de lesiones no diana existentes

Se trató a once pacientes. Los resultados se resumen en la tabla E.

TABLA E

5

Pacien- te	Sexo	Edad	Sitio primario	Histología	Sitios de enfermedad	Terapia sistémica previa	Sitio de TIL	Células (x10 <sup>9</sup> )	Dosis de IL- 2	Respues- ta (duración en meses)*
1	M	30	Cuello uterino	Adeno- escamosa	Pulmones, hilo, retro- peritoneal, ilíaco, cúpula vaginal	Cisplatino	Pulmón	101	7	NR
2	H	54	Amígdalas	Escamosa	Cuello, tejido blando	Docetaxel, cisplatino, 5- fluorouracilo (FU), cetuximab	Tejido blando del cuello	89	1	NR
3	M	53	Cuello uterino	Escamosa	Pulmones, hígado, pelvis	Cisplatino, paclitaxel, carboplatino, topotecán, ixabepilona, fase I	Pulmón	126	3	PR (2)
4	M	35	Cuello uterino	Escamosa	Mediastinio, hilo, pulmón	Cisplatino, gemcitabina, topotecán, paclitaxel	Ganglio para- traqueal	152	2	PR (9+)
5	M	55	Cuello uterino	Escamosa	Axila, pared abdominal	Carboplatino, 5-FU, irinotecán	Ganglio linfático axilar (LN)		7	NR
6	H	60	Desconocido (cuello)	Escamosa	Hígado, cuello, hueso, pared torácica, retro- peritoneal, periportal	Carboplatino, cisplatino, capecitabina	Hígado	150	6	NR
7	M	44	Cuello uterino	Escamosa	Mediastinio, supra- clavicular, cerebro	Cisplatino	LN de ventana aorto- pulmonar (AP)	90	5	NR
8	M	37	Cuello uterino	Adeno	Intra- peritoneal, retro- peritoneal, pared abdominal, superficie del hígado	Cisplatino	Intra- peritoneal de cuadrante superior derecho (RUQ)	75	8	PR (2+)
9	M	59	Cuello uterino	Adeno	Pared abdominal, pulmón	Cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab	Pulmón	33	8	Pendiente
10	M	58	Desconocido (pelvis)	Escamosa	Mediastinio, hilo, pulmón	Cisplatino, 5- FU, carboplatino, paclitaxel, cetuximab, irinotecán	LN de ventana AP	32	2	Pendiente
11	M	31	Cuello	Adeno-	Perihepático,	Cisplatino,	Intra-			

			uterino	escamosa	pelvis	paclitaxel	peritoneal pericecal			
NR = Sin respuesta.										

Tal como se muestra en la tabla E, de los ocho pacientes para los que había resultados disponibles, la terapia celular adoptiva con TIL reactivos frente a VPH dio como resultado tres pacientes con respuesta objetiva (OR), todos los cuales presentaban respuesta parcial (PR). Dos respuestas parciales siguen en curso a los dos meses (pacientes 3 y 4) después del tratamiento y una respuesta parcial (paciente 8) sigue en curso a los nueve meses después del tratamiento.

Se llevaron a cabo exploraciones de tomografía computerizada (TC) del tórax y la pelvis del paciente 4 antes del tratamiento y nueve meses después del tratamiento. Los resultados se muestran en las figuras 12A-F. Tal como se muestra en las figuras 12A-B, la lesión cancerosa en el ganglio linfático paraaórtico se había contraído en el 100% nueve meses después del tratamiento. Tal como se muestra en las figuras 12C-D, la lesión cancerosa en el ganglio linfático de hilo de pulmón izquierdo también se había contraído en el 100% nueve meses después del tratamiento. Tal como se muestra en las figuras 12E-F, la lesión cancerosa en el ganglio linfático iliaco común también se había contraído en el 100% nueve meses después del tratamiento.

Se llevaron a cabo exploraciones de obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) del hígado del paciente 8 antes del tratamiento y dos meses después del tratamiento. Los resultados se muestran en las figuras 14A-14B. Tal como se muestra en las figuras 14A-B, la masa cancerosa en el hígado se había contraído en el 100% dos meses después del tratamiento. También se llevaron a cabo exploraciones de TC del abdomen y la pelvis del paciente 8 antes del tratamiento y dos meses después del tratamiento. Los resultados se muestran en las figuras 14C-H. Tal como se muestra en las figuras 14C-D, la lesión cancerosa en el ganglio linfático retroperitoneal también se había contraído en el 100%. Tal como se muestra en las figuras 14E-F, la masa cancerosa en la pared abdominal también se había contraído en el 100%. Además, tal como se muestra en las figuras 14G-H, la masa pericólica izquierda cancerosa se había contraído drásticamente.

EJEMPLO 10

Este ejemplo proporciona resultados actualizados del estudio clínico descrito en el ejemplo 9 que se obtuvieron nueve meses después de obtenerse los resultados descritos en el ejemplo 9. Este ejemplo demuestra que la terapia celular adoptiva usando células T anti-VPH trata el cáncer.

**Métodos:** Se llevó a cabo ensayo clínico para tratar cánceres VPH+ metastásicos con linfocitos de infiltración tumoral (TIL) seleccionados para reactividad frente a E6 y E7 de VPH (VPH-TIL) tal como se describió en el ejemplo 9. La infusión de VPH-TIL estuvo precedida por acondicionamiento no mieloablativo y seguida por aldesleukina en bolo en dosis alta tal como se describió en el ejemplo 9. Se evaluó la reactividad frente a VPH mediante ensayos ELISPOT, de producción de IFN-gamma y de expresión de CD137.

**Resultados:** Se trató a nueve pacientes con cáncer de cuello uterino en el estudio. Recibieron una mediana de  $81 \times 10^9$  células T (intervalo de  $33$  a  $152 \times 10^9$ ) como una única infusión. Las células administradas por infusión presentaban reactividad frente a E6 y/o E7 de VPH de alto riesgo en 6/8 pacientes. Los dos pacientes sin reactividad frente a VPH no respondieron al tratamiento. Tres de los seis pacientes con reactividad frente a VPH demostraron respuestas tumorales objetivas mediante RECIST (1 PR y 2 CR). Un paciente tenía una mejor respuesta del 39%. Dos pacientes con metástasis muy extendidas tuvieron respuestas tumorales completas que seguían en curso 18 y 11 meses después del tratamiento. Un paciente con una respuesta completa tuvo un carcinoma de células escamosas VPH-16+ que no respondía a quimioterapia (paciente 4 del ejemplo 9) y el otro un adenocarcinoma VPH-18+ que no respondía a quimiorradiación (paciente 8 del ejemplo 9). Ambos pacientes demostraron una repoblación prolongada con células T reactivas frente a VPH después del tratamiento. Pudieron detectarse frecuencias aumentadas de células T específicas de VPH después de 13 meses en un paciente y 6 meses en el otro. Dos pacientes con TIL reactivos frente a VPH que no respondieron al tratamiento no presentaron repoblación con células T reactivas frente a VPH.

También se trató a seis pacientes con cáncer distinto de cuello uterino en el estudio. Un paciente experimentó una respuesta clínica objetiva, es decir, una respuesta parcial de un cáncer de amígdalas metastásico que seguía en curso cuatro meses después del tratamiento (figuras 20A-J).

Los resultados se muestran en las tablas F-G.

TABLA F

Cohorte de cáncer de cuello uterino de VPH-TIL									
Paciente	Edad	Histología	Tipo de	Sitios de enfermedad	de Terapia sistémica	Sitio de TIL	Células ( $\times 10^9$ )	Dosis de IL-	Respuesta (duración)

			VPH		previa			2	en meses)*
1	30	Adeno-escamosa	VPH-18	Pulmones, hilo, retroperitoneal, iliaco, cúpula vaginal	Cisplatino	Pulmón	101	7	PD
3	53	Escamosa	VPH-18	Pulmones, hígado, pelvis	Cisplatino, paclitaxel, carboplatino, topotecán, ixabepilona, fase I	Pulmón	126	3	PR (3)
4	35	Escamosa	VPH-16	Mediastinio, hilo, pulmón, iliaco	Cisplatino, gemcitabina, topotecán, paclitaxel	Ganglio paratraqueal	152	2	CR(18+)
5	55	Escamosa	VPH-16	Axila, pared abdominal	Carboplatino, 5-FU, irinotecán	LN axilar	81	7	PD
7	44	Escamosa	VPH-18	Mediastinio, supraclavicular, cerebro	Cisplatino	LN de ventana de AP	90	5	PD
8	37	Adeno	VPH-18	Paracólico, retroperitoneal, pared abdominal, superficie del hígado	Cisplatino	Intra-peritoneal de RUQ	75	8	CR (11+)
9	59	Adeno	VPH-18	Pared abdominal, pulmón	Cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab	Pulmón	33	8	PD
11	31	Adeno-escamosa	VPH-18	Perihepático, pelvis	Cisplatino, paclitaxel	Pericecal	46	9	PD
12	37	Adeno	VPH-18	Pelvis, retroperitoneo, axila, mediastinio, pulmón	Carboplatino, paclitaxel, ipilimumab	LN supra-clavicular	70	1	PD

\*Medido en meses desde la infusión de células.

TABLA G

Cohorte de cáncer distinto de cuello uterino de VPH-TIL										
Paciente	Sexo	Edad	Sitio primario	Histología	Sitios de enfermedad	Terapia sistémica previa	Sitio de TIL	Células (x10 <sup>9</sup> )	Dosis de IL-2	Respuesta (duración en meses)*
<b>Cabeza y cuello</b>										
2	M	54	Amígdalas	Escamosa	Cuello, tejido blando	Docetaxel, cisplatino, 5-FU, cetuximab	Tejido blando del cuello	89	1	PD
6	M	60	Desconocido (cuello)	Escamosa	Hígado, cuello, hueso, pared torácica, retro-peritoneo, periportal	Carboplatino, cisplatino, capecitabina	Hígado	150	6	PD
13	M	60	Amígdalas	Escamosa	Pulmón, hilo	Docetaxel, cisplatino, bevacizumab, cetuximab,	Pulmón	131	5	PR (4+)

gemcitabina										
Anal										
10	F	58	Desconocido (pelvis con AIN)	Escamosa	Mediastinio, hilo, pulmón	Cisplatino, 5-FU, carboplatino, paclitaxel, cetuximab, irinotecán	LN de ventana de AP	32	2	PD
14	F	49	Anal	Escamosa	Mediastinio, retro-peritoneo, pelvis	5-FU, mitomicina, cisplatino, carboplatino, paclitaxel unido a proteína	LN del cuello	69	3	PD
15	F	58	Anal	Escamosa	Hígado, retro-peritoneo, pelvis	5-FU, mitomicina, cisplatino	Hígado	48	6	PD

\* Medido en meses desde la infusión de células.

Estos datos muestran que VPH-TIL puede mediar en la regresión completa, duradera, de cáncer de cuello uterino metastásico y que la terapia celular puede mediar en la regresión completa de un tumor maligno epitelial. Estos datos también muestran que VPH-TIL puede mediar en la regresión de un cáncer de amígdalas metastásico.

5

#### EJEMPLO 11

Este ejemplo describe adicionalmente las respuestas tumorales completas obtenidas en el ejemplo 10 con terapia celular adoptiva usando células T anti-VPH.

10

#### Métodos

**Generación de VPH-TIL:** Se hicieron crecer linfocitos de infiltración tumoral (TIL) a partir de fragmentos de 2 mm de tumores escindidos tal como se describió anteriormente (Dudley *et al.*, J. Immunother., 26(4): 332-42 (2003)). Después de dos a tres semanas de crecimiento de linfocitos, se evaluaron los cultivos para determinar la composición celular mediante citometría de flujo y para determinar la reactividad frente a E6 y E7 específicos de tipo de VPH mediante ensayo de producción de interferón (IFN)-gamma tal como se describe en la sección de evaluación de la reactividad frente a oncoproteínas de VPH a continuación. Se realizó un análisis de citometría de flujo con anticuerpos fluorescentes específicos para CD3, CD4, CD8 y CD56 (BD Biosciences). Se seleccionaron cultivos para una expansión adicional basándose en la reactividad frente a las oncoproteínas de VPH, crecimiento rápido, alta pureza de células T y alta frecuencia de células T CD8+. La expansión hasta los números de células usados para el tratamiento se logró con un protocolo de expansión rápida con matraces permeables a gases G-REX (Dudley *et al.*, J. Immunother., 26(4): 332-42 (2003); Jin *et al.*, J. Immunother., 35(3): 283-92 (2012)). Se certificaron los productos de infusión en cuanto a números de células viables, pureza de células T (citometría de flujo), potencia (producción de IFN-γ), esterilidad (estudios microbiológicos) y ausencia de células tumorales (citopatología).

15

20

25

**Tratamientos de pacientes:** Los pacientes tenían cáncer de cuello uterino metastásico y enfermedad medible. Se requirió tratamiento previo con un agente de platino en entorno o bien de quimiorradiación primaria o bien metastásico. El régimen de acondicionamiento consistió en ciclofosfamida 60 mg/kg i.v. diariamente durante dos días seguida por fludarabina 25 mg/m<sup>2</sup> i.v. diariamente durante cinco días. Se administraron células i.v. a lo largo de 20 a 30 minutos. Se inició aldesleukina 720.000 UI/kg/dosis i.v. dentro del plazo de 24 horas tras la infusión de células y se continuó cada ocho horas hasta que se detuvo por toxicidad o para un máximo de 15 dosis. Se inició filgrastim el día después de la infusión de células y se continuó hasta que se recuperaron los recuentos de neutrófilos.

30

35

**Respuestas tumorales:** Se obtuvieron estudios de obtención de imágenes de nivel inicial dentro del plazo de cuatro semanas antes de iniciar el régimen de acondicionamiento. Se obtuvieron imágenes de seguimiento seis semanas después del tratamiento, mensualmente para tres evaluaciones, cada tres meses para tres evaluaciones y después cada 6 meses para dos evaluaciones.

40

**Evaluación de la reactividad frente a oncoproteínas de VPH:** Se determinó la reactividad frente a VPH mediante cultivo conjunto de células T (de 40.000 a 100.000 células) con células dendríticas inmaduras autólogas (40.000 células) cargadas con 1 μM de combinaciones de péptidos que abarcaban E6, E7, gp101 o EBNA1 y

45

BZLF1 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las combinaciones de péptidos incluyeron péptidos de 15 meros con solapamientos de 11 aminoácidos. Se generaron células dendríticas a partir de la fracción adherente de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o de células CD14+ aisladas a partir de PBMC usando aislamiento con perlas magnéticas (Miltenyi Biotec) mediante cultivo en DMEM complementado con suero humano al 10% y GM-CSF 1000 UI/ml e IL-4 500 UI/ml durante de cinco a seis días. Se generaron células T de control anti-VEB antes del tratamiento cultivando PBMC con combinaciones de péptidos de EBNA1 y BZLF1 (10 µg/ml) en medios AIM-V/RPMI complementados con suero humano al 10% e IL-2 3000 UI/ml. Para ensayos de producción de IFN- $\gamma$ , la concentración de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes se determinó después de cultivo conjunto durante la noche (R&D Systems (Minneapolis, MN) o Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)).

Se realizó un análisis de ELISPOT (Mabtech (Cincinnati, OH)) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se sembraron placas de ELISPOT (WALPSWU de Millipore (Billerica, MA)) previamente recubiertas con anticuerpo de captura (clon 1-D1K, Mabtech) con 10.000 células efectoras y 40.000 células diana. Después de 16 a 18 horas de incubación, se detectó la secreción de IFN- $\gamma$  mediante adición de un anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  biotinilado (7-B6-1 biotina, Mabtech) durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la incubación con estreptavidina-fosfatasa alcalina (Mabtech) durante una hora, se añadió reactivo de sustrato (5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato de p-toluidina/cloruro de nitro-azul de tetrazolio, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Gaithersburg, MD)) para permitir la formación de puntos. Se detuvo la formación de puntos aclarando con agua corriente. Se contaron los puntos usando un lector automatizado IMMUNOSPOT (Cellular Technology, Ltd. (Shaker Heights, OH)). Se definieron respuestas de ELISPOT frente a E6 o E7 como positivas si eran más de dos veces el control negativo y más de 10 puntos/pocillo.

Se realizaron ensayos de regulación por incremento de CD137 mediante análisis de citometría de flujo después de un cultivo conjunto de 20 a 24 horas (Wolfl *et al.*, Blood, 110(1): 201-10 (2007)). Se marcaron las células con anticuerpos fluorescentes frente a CD137, CD4, CD8 y CD3 (BD Biosciences, San Jose, CA). Se contratiñeron con yoduro de propidio (BD Pharmingen, Franklin Lakes, Nueva Jersey) antes de la adquisición de datos con un analizador celular BD FACSCANTO II (BD Biosciences). Se analizaron los datos con software FLOWJO, versión 10 de Mac (TreeStar, Ashland, OR).

*Inmunohistoquímica:* Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas en el laboratorio de patología, NCI, con secciones de 4 µM a partir de tumores metastásicos fijados en formalina, incrustados en parafina, según procedimientos convencionales. Tras la desparafinación, rehidratación y recuperación de antígenos, se incubaron las secciones de tumor con clon 1F6 anti-CD4 humano (Novocastra, Wetzlar, Alemania) a una dilución de 1:80 durante 2 horas, clon CD8/144B anti-CD8 humano (Dako Corp., Glostrup, Dinamarca) a una dilución de 1:50 durante 2 horas, o clon JC8 anti-p16 humano (Santa Cruz, Dallas, Texas) a una dilución de 1:200 durante 32 minutos. Los portaobjetos teñidos para CD4 se teñieron en un dispositivo AUTOSTAINER Link 48 (Dako Corp.) y se visualizaron con el sistema de detección ENVISION FLEX+ (Dako Corp.). Los portaobjetos teñidos para CD8 y p16 se teñieron con un dispositivo VENTANA Benchmark XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) y se visualizaron con el sistema de detección ULTRAVIEW (Ventana Medical Systems). Se capturaron imágenes con microscopía a 10x.

*Determinación de subconjuntos de linfocitos a partir de sangre periférica:* Se realizaron hemogramas completos con determinación diferencial manual por el laboratorio de hematología del centro clínico. Se realizó el fenotipado de linfocitos para células T, B y NK por el laboratorio de citometría de flujo de inmunología del NIH usando criterios normalizados.

*Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR):* Se aisló ARN a partir de un fragmento de 2 mm de tejido tumoral reciente usando un kit RNEASY (Qiagen, Valencia, CA). Se realizó síntesis de ADN de primera cadena por transcripción inversa usando supermezcla de ADNc QSCRIPT (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD). Se usaron secuencias de cebador y sonda de TAQMAM producidas de manera personalizada (Applied Biosciences, Foster City, CA) para VPH16-E6, VPH16-E7, VPH18-E6 y VPH18-E7. Se usó un conjunto de sondas de cebador de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fácilmente disponible para normalizar los niveles de expresión de oncoproteínas (Hs02758991\_g1, Applied Biosciences, Foster City, CA). Se realizó RT-PCR en un sistema de PCR en tiempo real rápida 7500 (Applied Biosciences).

*Análisis de niveles de citocinas en suero:* Se midieron los niveles de 17 citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), IFN- $\gamma$ , proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 $\beta$  y factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  en sueros de pacientes extraídos antes y después del tratamiento con VPH-TIL usando el ensayo de 17 plex de citocinas humanas BIO-PLEX Pro (Bio-Rad Laboratories) según las instrucciones del fabricante. Se adquirieron los niveles de citocinas mediante el sistema BIO-PLEX 200 (Bio-Rad).

*Casos clínicos*

Al paciente 4 se le diagnosticó cáncer de cuello uterino de células escamosas, mal diferenciado, en estadio 3B, catorce meses antes del tratamiento con VPH-TIL. El paciente se trató inicialmente con cisplatino, vincristina y bleomicina seguida por quimiorradioterapia con gemcitabina más cisplatino, y braquiterapia. Dos meses después, se detectó cáncer metastásico en ganglios linfáticos paratraqueales (confirmado mediante biopsia), subcarinales e hilares bilaterales. Recibió cuatro ciclos de topotecán y paclitaxel antes de la progresión de la enfermedad, y después se remitió para el ensayo clínico descrito en los ejemplos 9 y 10. Se preparó VPH-TIL a partir de un ganglio linfático paratraqueal resecaado. El paciente recibió quimioterapia que producía linfopenia seguida por una única infusión intravenosa de  $152 \times 10^9$  VPH-TIL y dos dosis de aldesleukina. Se detuvo la dosificación de aldesleukina debido a fatiga del paciente. Se le dio el alta del hospital tras la recuperación hematológica, 12 días después de la infusión de células.

Al paciente 8 se le diagnosticó adenocarcinoma en estadio IB2 del cuello uterino 17 meses antes del tratamiento con VPH-TIL. Su tumor primario se trató con quimiorradiación con cisplatino seguida por braquiterapia. Cinco meses después, se constató que tenía un tumor primario resistente a la quimiorradiación (confirmado por biopsia). Una cirugía de rescate identificó implicación de ganglios linfáticos paraaórticos e ilíacos y enfermedad pélvica residual. Su cáncer presentó progresión implicando a ganglios linfáticos retroperitoneales adicionales y la superficie del hígado, y desarrolló hidroureteronefrosis derecha y émbolos pulmonares bilaterales, lo cual requirió una endoprótesis de uréter y terapia anticoagulación. Después se trató al paciente según el protocolo descrito en este ejemplo usando VPH-TIL generados a partir de dos nódulos peritoneales. Recibió quimioterapia que producía linfopenia seguida por  $75 \times 10^9$  células de VPH-TIL y ocho dosis de aldesleukina. Se detuvo la dosificación de aldesleukina debido a hipoxia secundaria a edema pulmonar, que requirió oxígeno complementario y se resolvió con diuresis. El alta del hospital se produjo 11 días después de la infusión de células.

*Respuestas clínicas completas*

Ambos pacientes tenían enfermedad progresiva diseminada antes del tratamiento (figura 12A-F; figura 14A-H; figura 15 A-B; figura 16A-D; figura 21A-H; y figura 22A-H). El paciente 4 tenía tumores metastásicos que implicaban a un ganglio linfático mediastinal paraaórtico, hilos pulmonares bilaterales, ganglios linfáticos subcarinales y ganglios linfáticos ilíacos (figura 15 A; figura 12A-F; y figura 21A-H). El paciente 8 tenía cáncer metastásico que implicaba a al menos siete sitios: dos tumores en la superficie del hígado, ganglios linfáticos paraaórticos y de aortocava, la pared abdominal, una masa pericólica en la parte izquierda de la pelvis, y un nódulo que obstruía la parte derecha del uréter (figura 15 B; figura 14A-H; figura 16A-D; y figura 22AH). Se trató a cada paciente con una única infusión de células T, lo cual dio como resultado la regresión tumoral que se produjo a lo largo de meses (figura 15A-B). Ambos pacientes experimentaron respuestas tumorales completas objetivas, que seguían en curso 18 y 11 meses después del tratamiento (figura 21AH (paciente 4) y figura 22A-H (paciente 8)). Se extirpó del paciente 8 una endoprótesis de uréter previamente colocada tras la regresión del tumor que obstruía su parte derecha del uréter (figura 22 G y H). Ningún paciente recibió terapia adicional. Ambos pacientes habían vuelto a un empleo a tiempo completo.

*Toxicidad de VPH-TIL*

No hubo ninguna toxicidad aguda relacionada con la infusión de células. No se produjo ningún acontecimiento adverso autoinmunitario. Ambos pacientes presentaron aumentos de citocinas en suero transitorias (figura 17A-B) que estuvieron asociados con fiebres, pero ningún paciente desarrolló síndrome de liberación de citocinas grave. Se determinaron los niveles de citocinas en suero criopreservado. Se realizaron pruebas para detectar las siguientes citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, G-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IFN- $\gamma$ , MCP-1, proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP-1 $\beta$ ) y TNF- $\alpha$ . Se presentan citocinas con niveles mayores de dos veces el nivel inicial en dos medidas consecutivas. Se dosificó aldesleukina cada ocho horas después de la infusión de células (el paciente 4 recibió dos dosis y el paciente 8 recibió ocho dosis). Se administró GCSF diariamente comenzando el día después de la infusión de células y continuó hasta que se recuperaron los recuentos de neutrófilos (el paciente 4 recibió 11 dosis y el paciente 8 recibió nueve dosis).

Se dosificó aldesleukina hasta la tolerancia mediante diseño de protocolo, deteniéndose debido a fatiga en el paciente 4 y a disnea en el paciente 8. En la tabla H se indican acontecimientos adversos de grado 3 y de grado 4. Las toxicidades más comunes fueron hematológicas y los efectos esperados del régimen de acondicionamiento que produce linfopenia (ciclofosfamida y fludarabina).

TABLA H

Toxicidad	Paciente 4	Paciente 8
Anemia	X	X
Neutropenia	X	X
Linfopenia	X	X

Leucopenia	X	X
Trombocitopenia	X	X
Neutropenia febril	X	X
Infeción		X
Fatiga	X	
Náuseas/vómitos	X	X
Síncope <sup>†</sup>		X
Hemorragia gastrointestinal inferior (GI)*		X
Hematuria*		X
Hipofosfatemia	X	
<sup>†</sup> Un único episodio de etiología desconocida 15 días después del tratamiento. *Asociado con colitis y cistitis por radiación.		

*Expresión de antígeno tumoral e infiltración de células T*

5 Los tumores metastásicos escindidos para la generación de VPH-TIL fueron un carcinoma de células escamosas del paciente 4 y un adenocarcinoma del paciente 8. Las células malignas expresaban p16INK4A, un indicador sensible de infección por VPH de alto riesgo. Se determinaron el tipo de VPH y los niveles de expresión de E6 y E7, los antígenos diana de VPH-TIL, para el tumor de cada paciente mediante reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR). El paciente 4 tenía un cáncer VPH-16+ y el paciente 8 tenía un cáncer VPH-18+. El infiltrado de células T en tumores a partir de ambos pacientes mostró una composición mixta predominantemente con células CD8+ en el paciente 4 y células CD4+ en el paciente 8. Tanto las células T CD4+ como las CD8+ crecieron a partir de los tumores escindidos. Los VPH-TIL administrados por infusión estaban compuestos por el 19% de células T CD4+ y el 79% de células T CD8+ para el paciente 4, y por el 15% de células T CD4+ y el 87% de células T CD8+ para el paciente 8.

15 *Selección como diana de oncoproteínas de VPH mediante VPH-TIL*

20 Los VPH-TIL administrados al paciente 4 eran reactivos frente a las oncoproteínas tanto E6 como E7 tal como se demuestra mediante ensayos de producción de interferón (IFN)- $\gamma$  y ELISPOT (figura 18A y C). El cinco por ciento y más del siete por ciento de las células administradas por infusión mostraron respuestas frente a E6 o E7, respectivamente, mediante ensayo ELISPOT (figura 18C y D). Las respuestas de E6 estuvieron mediadas por células T CD8+, y las respuestas de E7 estuvieron mediadas por células CD4+ y CD8+. En total, el 14 por ciento de las células administradas por infusión presentaron reactividad frente a VPH tal como se mide mediante ensayo de regulación por incremento de CD137. Para el paciente 8, VPH-TIL eran reactivos frente a E7 (figura 18B), respondiendo el cuatro por ciento de las células T al antígeno mediante ensayo ELISPOT (figura 18D). Esta respuesta estaba mediada principalmente por células T CD4+.

*Repoblación con células T reactivas frente a oncoproteínas*

30 La infusión de VPH-TIL estuvo seguida por aumentos rápidos de células T CD4+ y CD8+ en sangre periférica, pero no de células NK y B (figura 19A-B). La expansión de los números de células T administradas por infusión estuvo asociada con el establecimiento y la persistencia de la reactividad de células T en sangre periférica frente a las oncoproteínas de VPH tal como se mide mediante ensayos de producción de IFN- $\gamma$ , ELISPOT y regulación por incremento de CD137 (figura 19C-F). Ambos pacientes tenían poca, si es que tenían, reactividad frente a E6 o E7 antes del tratamiento. Después del tratamiento, el paciente 4 adquirió reconocimiento robusto de células T de E6 y E7. Para el paciente 8, este reconocimiento era más débil pero no obstante era detectable y, de manera que concuerda con las células T administradas por infusión, estaba dirigido únicamente frente a E7. Un mes después del tratamiento, el 12 por ciento de las células T de sangre periférica del paciente 4 eran reactivas frente a oncoproteínas (el siete por ciento frente a E6 y el cinco por ciento frente a E7) (figura 19E). La reactividad frente a estos antígenos se mantuvo mostrando el uno por ciento de células T de sangre periférica reconocimiento de oncoproteínas cuatro y 13 meses después de la infusión de células (figura 19E). El paciente 8 mostró el 0,4 por ciento de células T reactivas frente a VPH un mes después del tratamiento (figura 19F). Esta reactividad se mantuvo, aunque a niveles inferiores, tres y seis meses después del tratamiento (figura 19 D y F). De manera que concuerda con la reactividad de los subconjuntos de células T en los VPH-TIL administrados por infusión, las células T específicas de VPH que repoblaron a los pacientes eran principalmente células T CD8+ reactivas frente a E6 y E7 para el paciente 4, y células T CD4+ reactivas frente a E7 para el paciente 8.

EJEMPLO 12

50 Este ejemplo proporciona resultados actualizados de los pacientes 4 y 8 a partir del estudio clínico descrito en los ejemplos 10 y 11 que se obtuvieron cuatro meses después de obtenerse los resultados descritos en los ejemplos 10 y 11. Este ejemplo demuestra que la terapia celular adoptiva usando células T anti-VPH trata el cáncer.

Las respuestas tumorales completas objetivas de los pacientes 4 y 8, que se trataron tal como se describió en los ejemplos 10 y 11, seguían en curso 22 y 15 meses después del tratamiento, respectivamente.

- 5 Debe interpretarse que el uso de los términos “un” y “una” y “el/la” y “al menos uno” y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Debe interpretarse que el uso del término “al menos uno” seguido por una lista de uno o más elementos (por ejemplo, “al menos uno de A y B”) significa un elemento seleccionado de los elementos indicados (A o B) o cualquier combinación de dos o más de los elementos indicados (A y B), a menos
- 10 que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan “incluyendo, pero sin limitarse a”) a menos que se indique lo contrario. Se pretende que la mención de intervalos de valores en el presente documento sirva simplemente como método abreviado de hacer referencia de manera individual a cada valor independiente que se encuentre dentro del intervalo, a menos que
- 15 se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor independiente se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara de manera individual en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto.

**REIVINDICACIONES**

1. Método de preparación de una población de células T específicas de virus del papiloma humano (VPH), comprendiendo el método:
 

5 dividir una muestra de tumor positiva para VPH en múltiples fragmentos;

cultivar por separado los múltiples fragmentos en presencia de tan sólo una citocina, en el que la citocina es interleucina (IL)-2, IL-7, IL-15 o IL-12;

10 obtener células T a partir de los múltiples fragmentos cultivados;

someter a prueba por separado las células T de los múltiples fragmentos para detectar uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH;

15 seleccionar las células T que muestran uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; y

expandir el número de células T seleccionadas para producir una población de células T específicas de VPH.
2. Método según la reivindicación 1, en el que expandir el número de células T seleccionadas comprende expandir el número de células usando una o ambas de (i) células alimentadoras alogénicas irradiadas y (ii) células alimentadoras autólogas irradiadas y uno o ambos de (iii) anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón y (iv) interleucina (IL)-2.
- 25 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la citocina es IL-2.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que expandir el número de células T seleccionadas comprende usar una o ambas de (i) células alimentadoras alogénicas irradiadas y (ii) células alimentadoras autólogas irradiadas y ambos de (i) anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón y (ii) interleucina (IL)-2 para producir una población de células T específicas de VPH.
- 30 5. Método según la reivindicación 1, en el que la citocina es IL-15.
6. Método según la reivindicación 4 ó 5, en el que expandir el número de células T seleccionadas comprende usar (i) células alimentadoras alogénicas irradiadas, (ii) anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón y (iii) interleucina (IL)-2.
- 40 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la población de células T específicas de VPH reconocen células cancerosas positivas para VPH 16.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la población de células T específicas de VPH reconocen E6 de VPH 16 o E7 de VPH 16.
- 45 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la población de células T específicas de VPH reconocen células cancerosas positivas para VPH 18.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y 9, en el que la población de células T específicas de VPH reconocen E6 de VPH 18 o E7 de VPH 18.
- 50 11. Población de células T específicas de VPH preparada según un método que comprende
 

55 dividir una muestra de tumor positiva para VPH en múltiples fragmentos;

cultivar por separado los múltiples fragmentos en presencia de tan sólo una citocina, en la que la citocina es IL-2;

obtener células T a partir de los múltiples fragmentos cultivados;

60 someter a prueba por separado las células T de los múltiples fragmentos para detectar uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH;

seleccionar las células T que muestran uno o ambos de reconocimiento de tumor positivo para VPH autólogo específico y reconocimiento de antígeno de VPH; y

65

expandir el número de células T seleccionadas para producir una población de células T específicas de VPH para terapia celular adoptiva;

para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer en un mamífero,

5

opcionalmente en la que el cáncer es un cáncer positivo para VPH.

12. Población de células T específicas de VPH para su uso según la reivindicación 11, en la que el cáncer es cáncer del cuello uterino, orofaringe, ano, canal anal, anorrecto, vagina, vulva o pene.

10

13. Población de células T específicas de VPH para su uso según la reivindicación 11 ó 12, que comprende además un agente quimioterápico no mieloablativo que produce linfopenia.

14. Población de células T específicas de VPH para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en la que o bien

15

(a) las células T se modifican para expresar un factor de crecimiento de células T que fomenta el crecimiento y la activación de las células T; o bien

20

(b) un factor de crecimiento de células T que fomenta el crecimiento y la activación de las células T debe administrarse al mamífero o bien de manera concomitante con las células T o bien de manera posterior las células T.

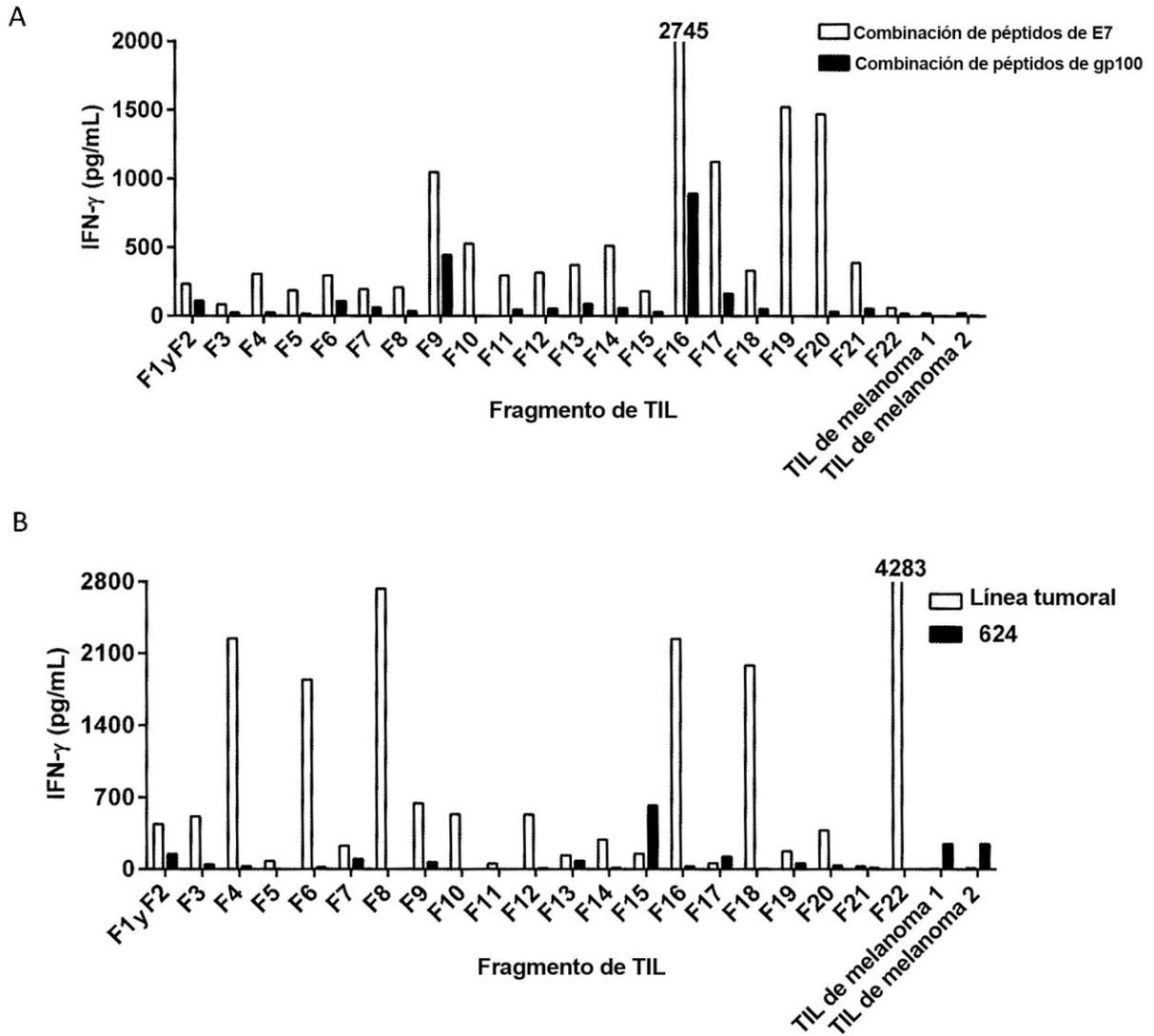
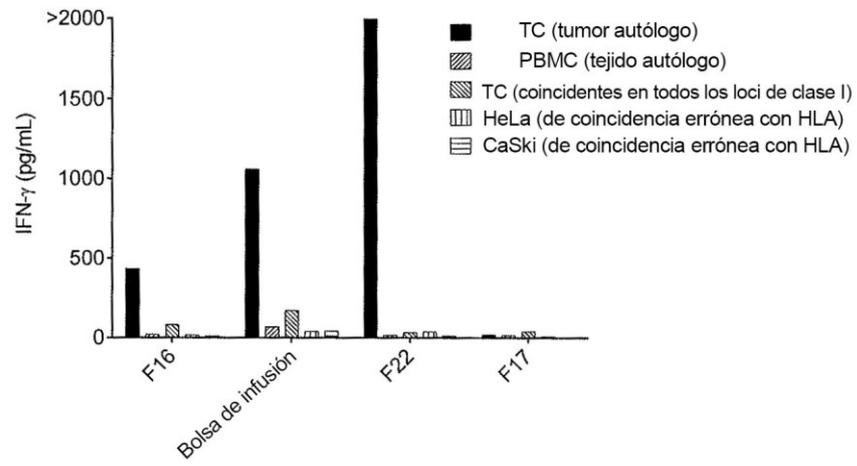
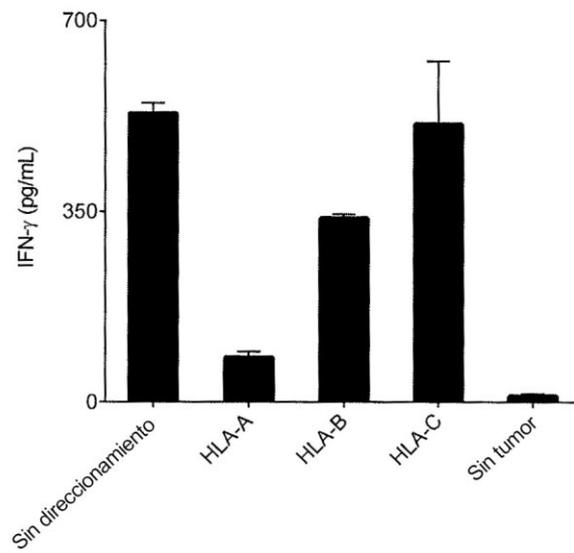


FIG. 1

A



B



C

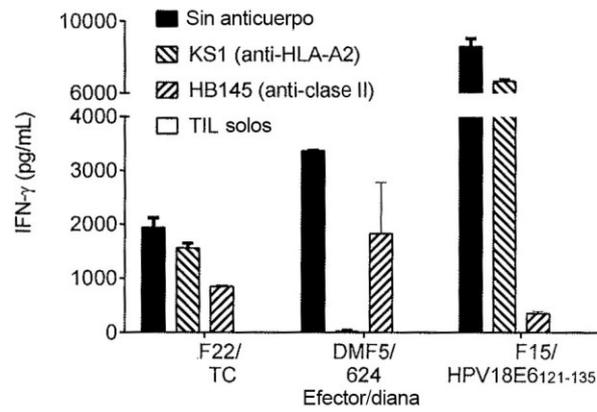


FIG. 2

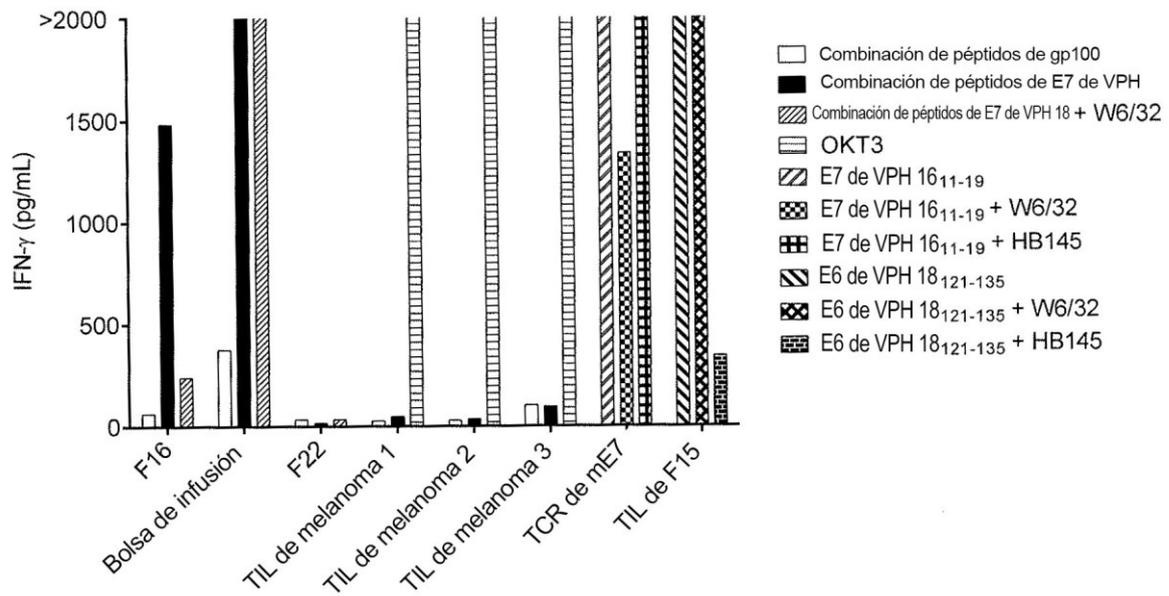


FIG. 3

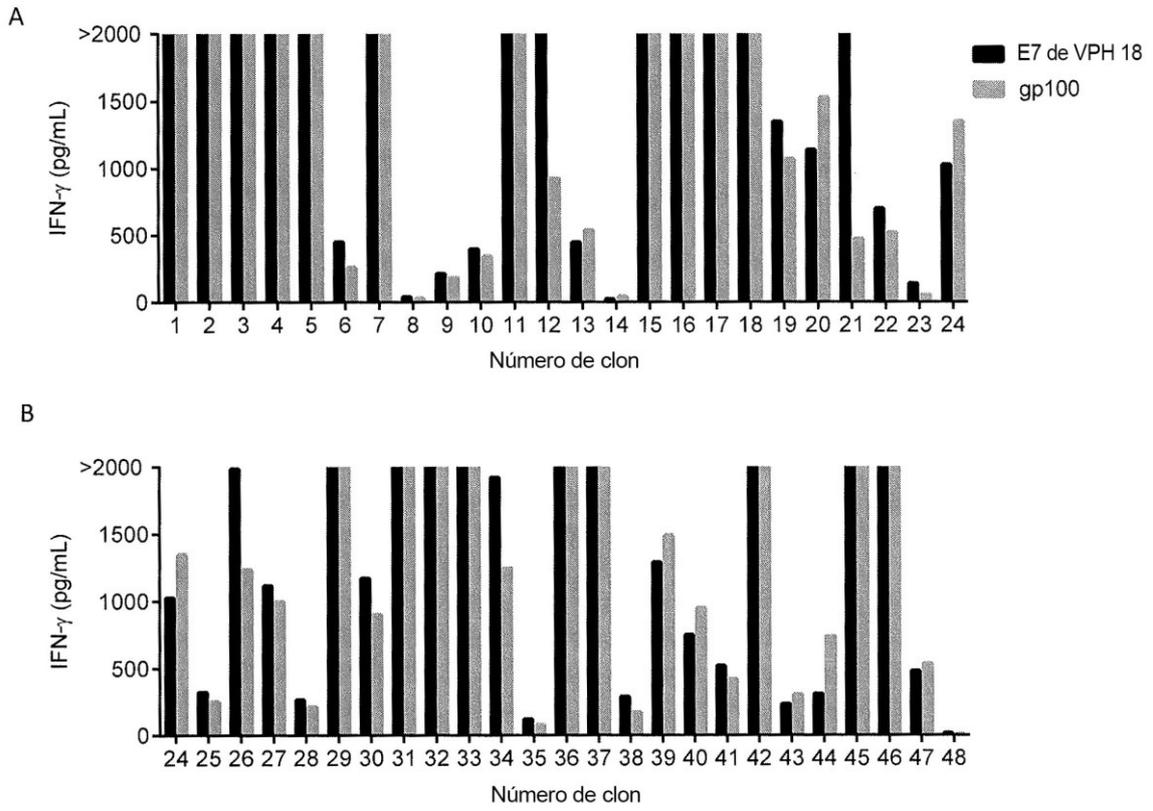


FIG. 4

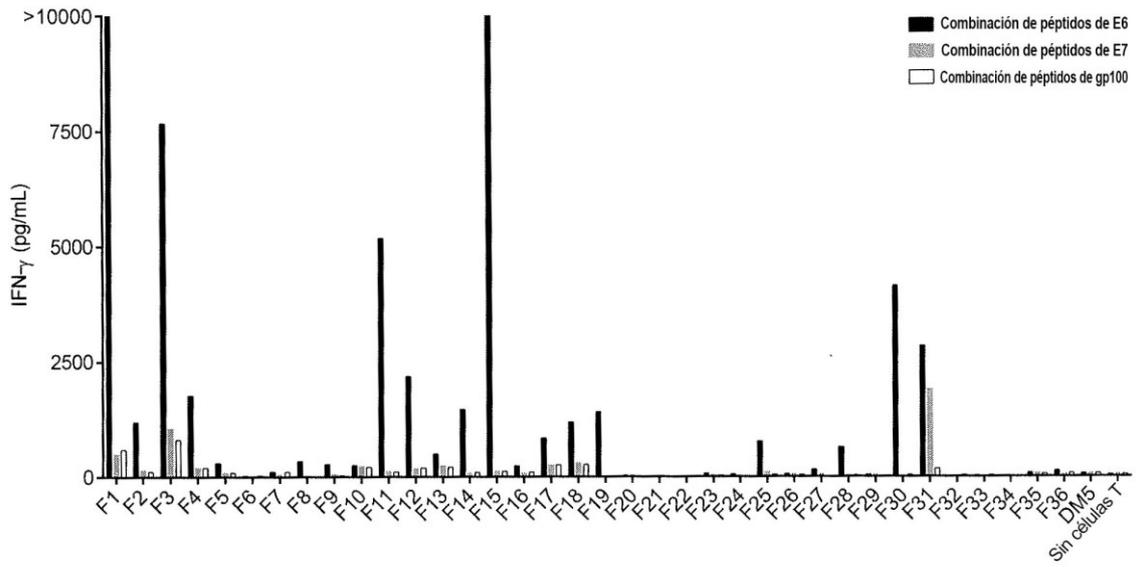


FIG. 5

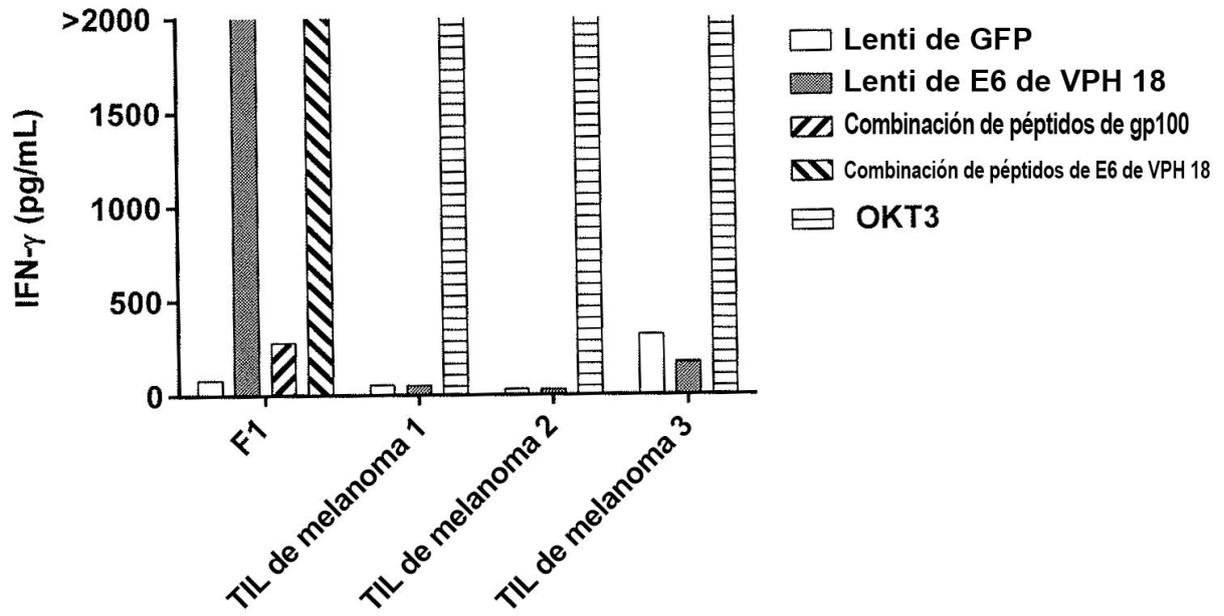


FIG. 6

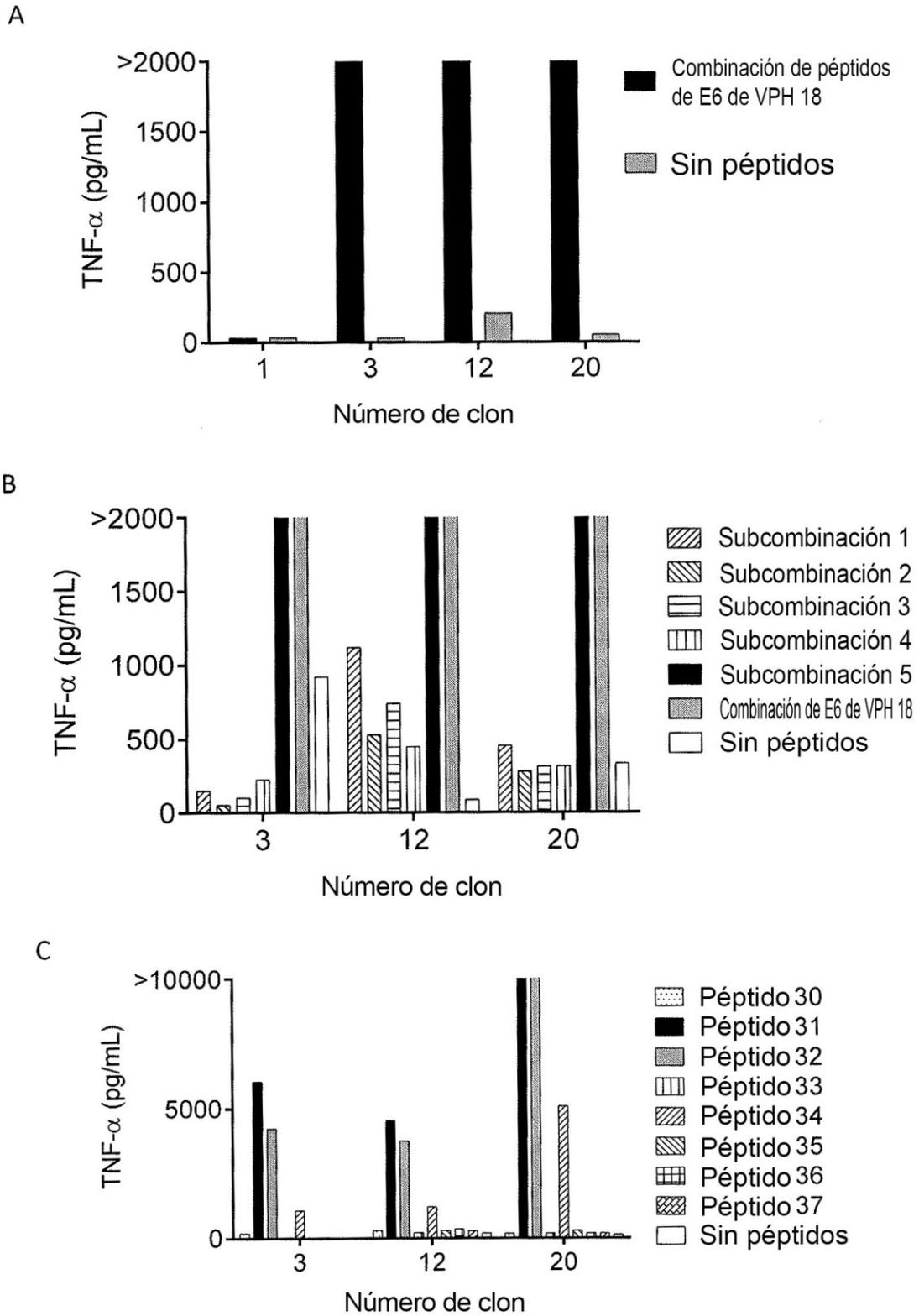
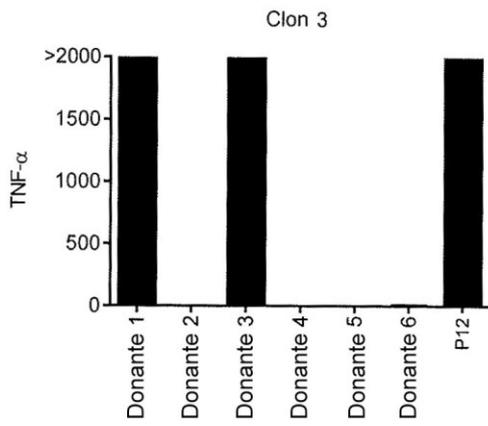
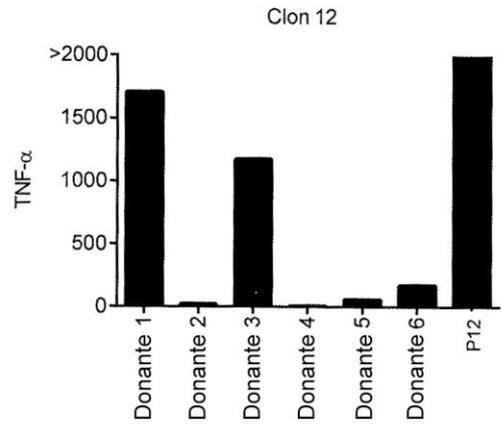


FIG. 7

A



B



C

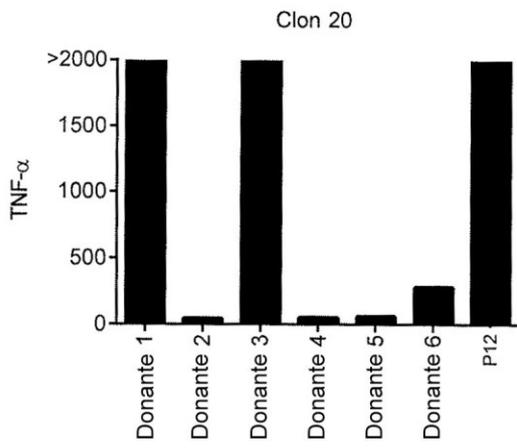


FIG. 8

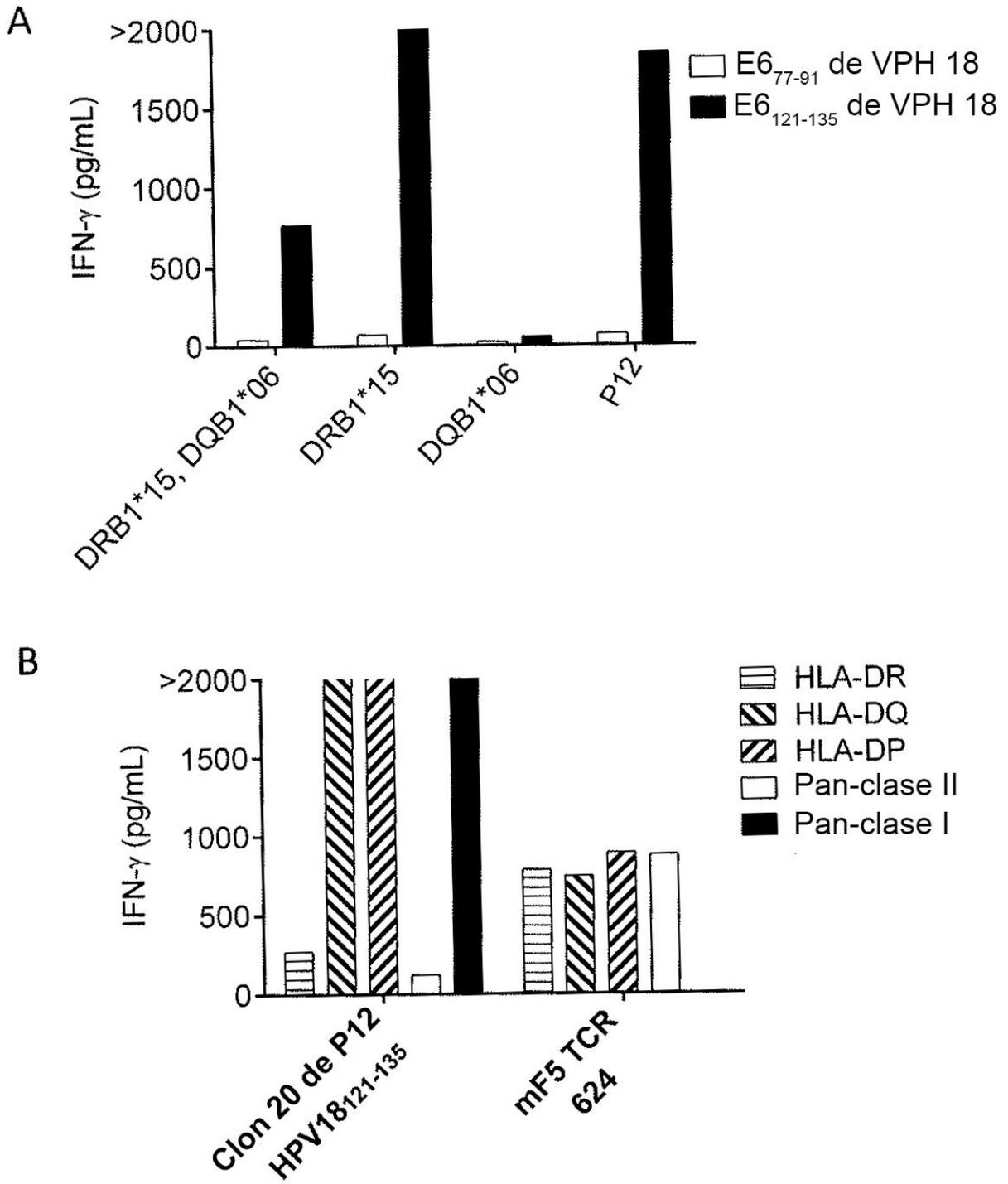


FIG. 9

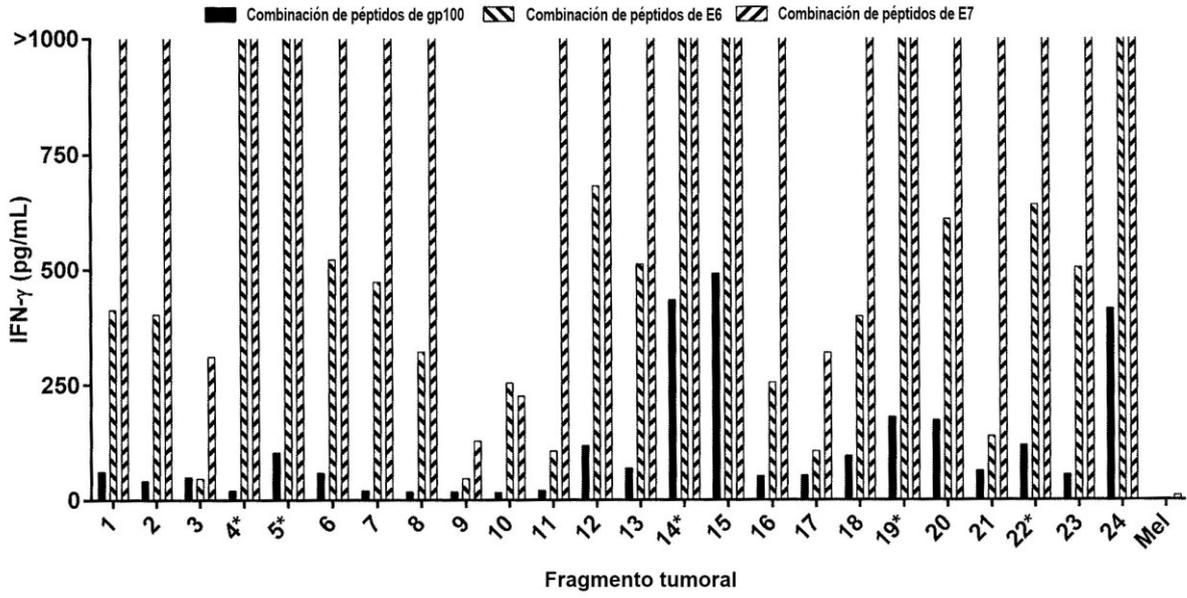


FIG. 10

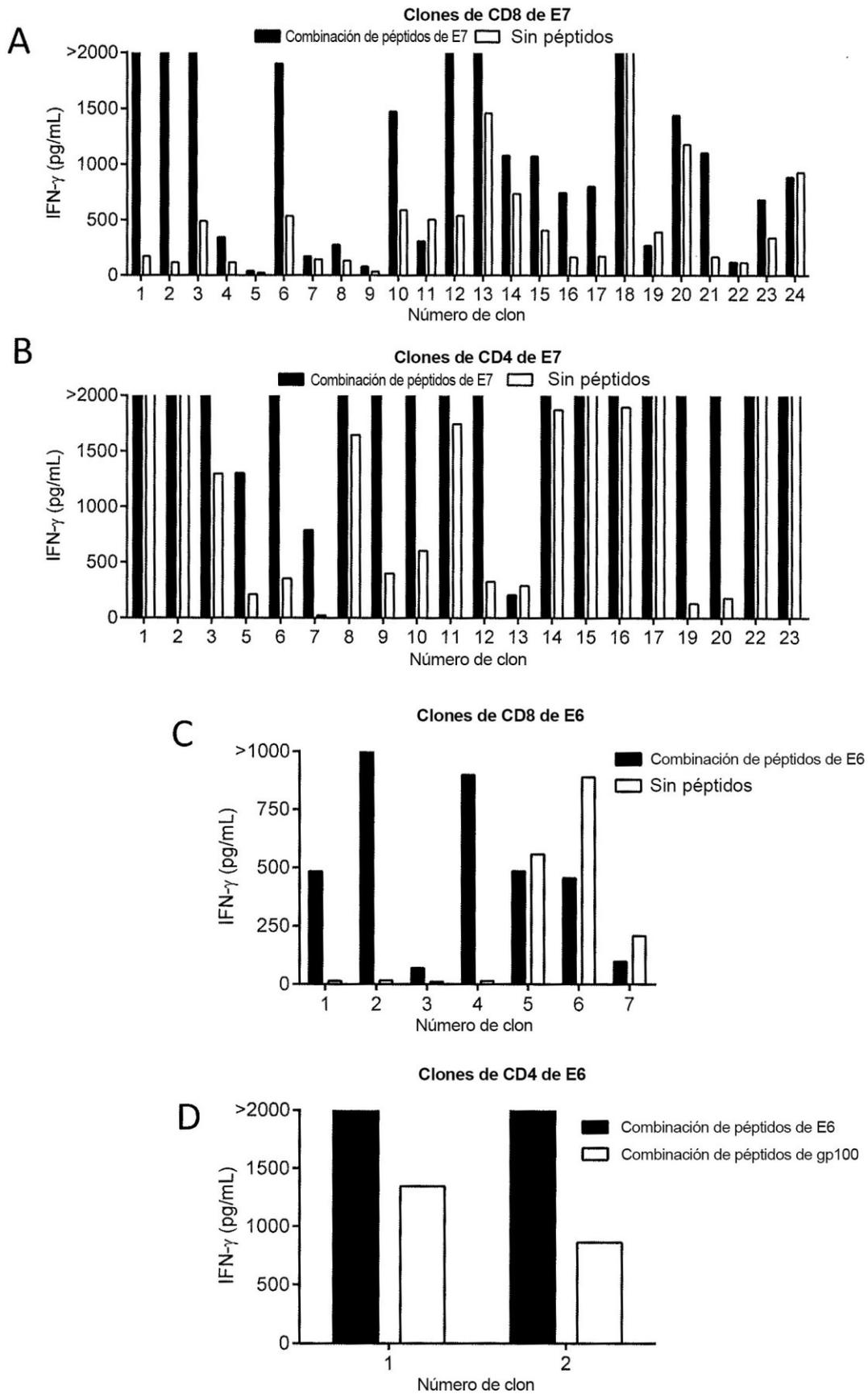


FIG. 11

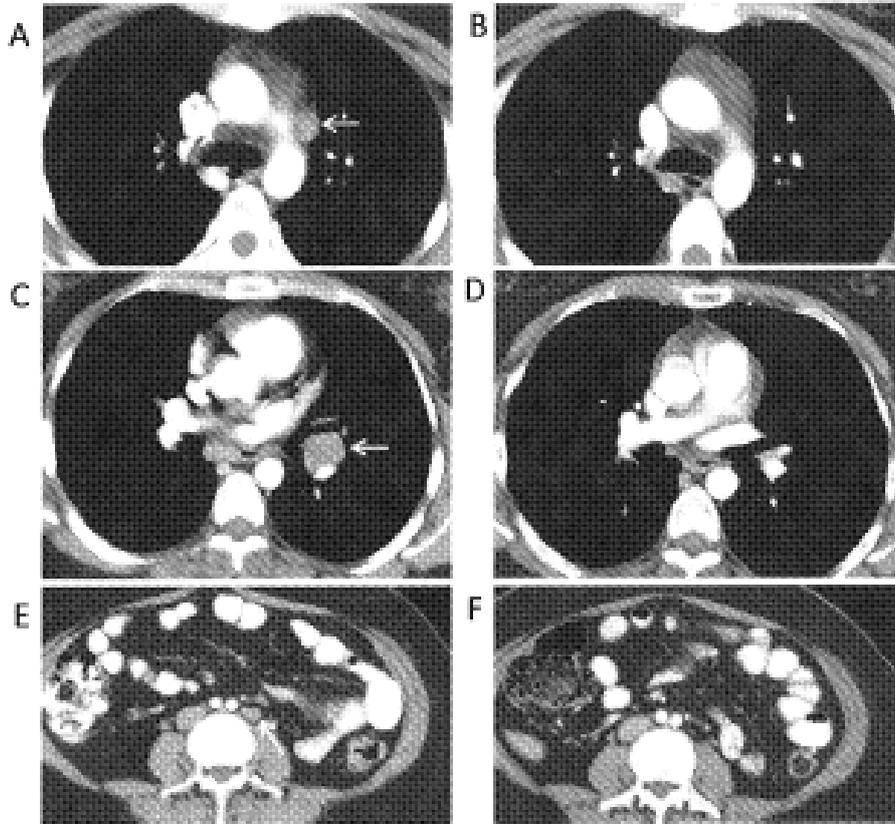


FIG. 12

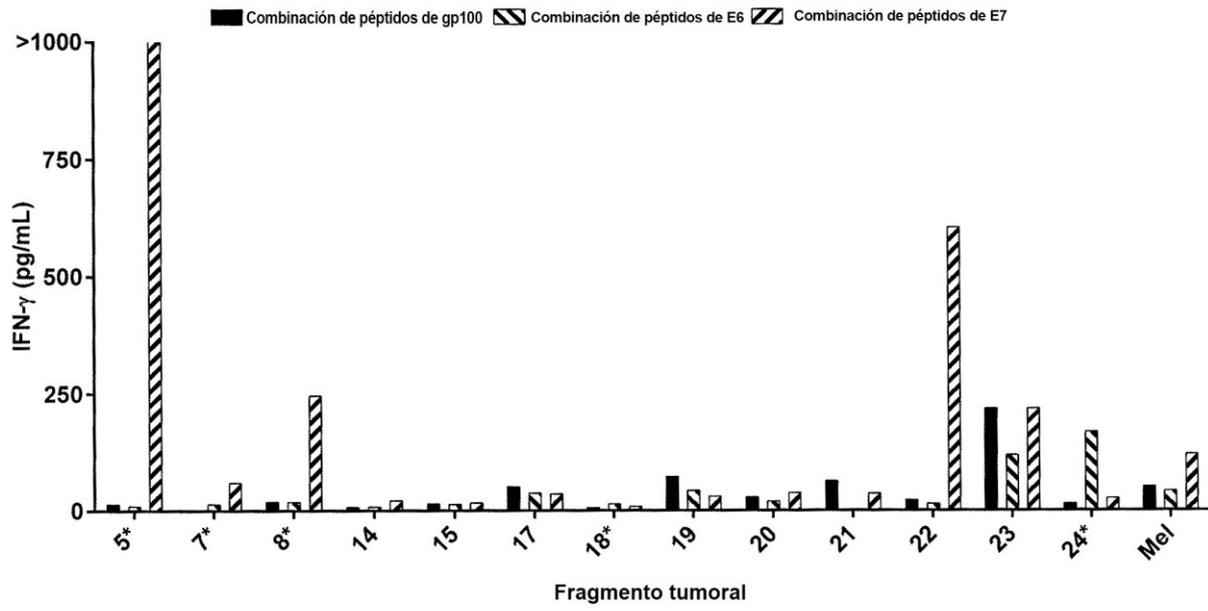


FIG. 13

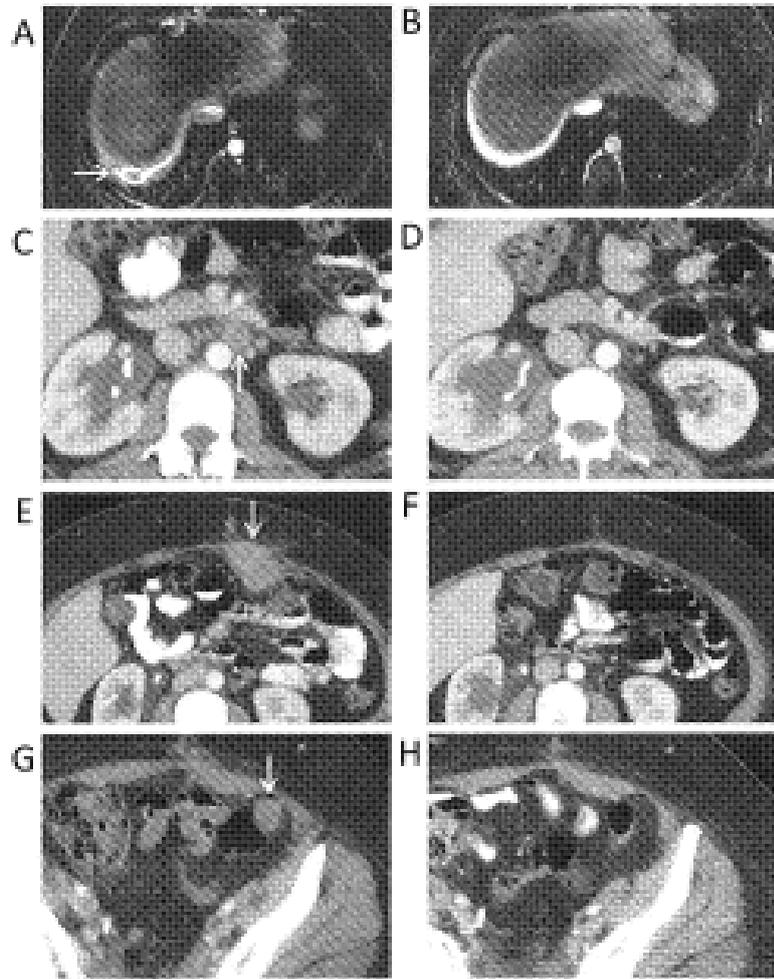


FIG. 14

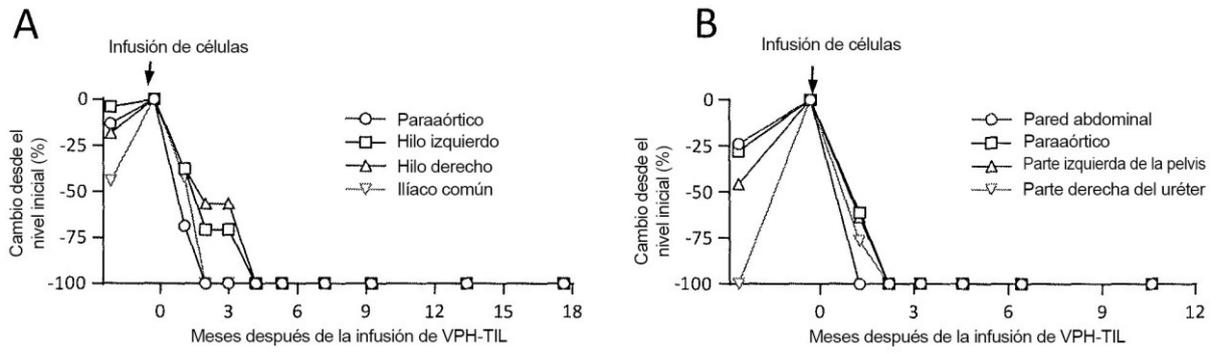


FIG. 15

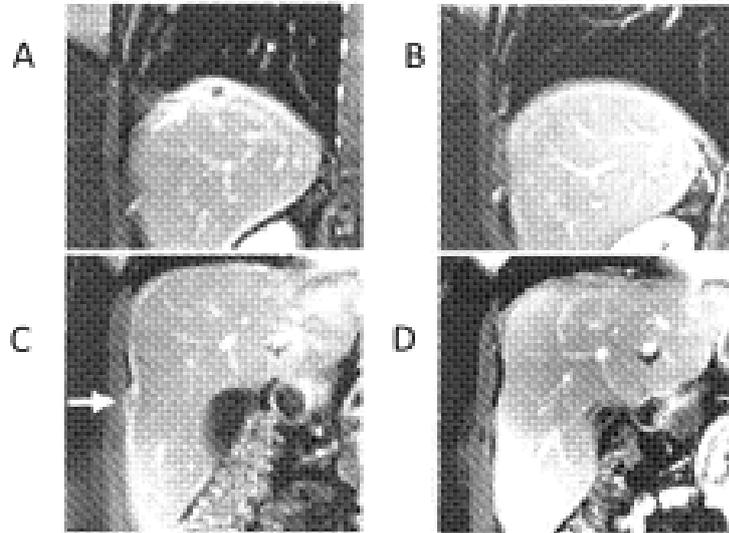
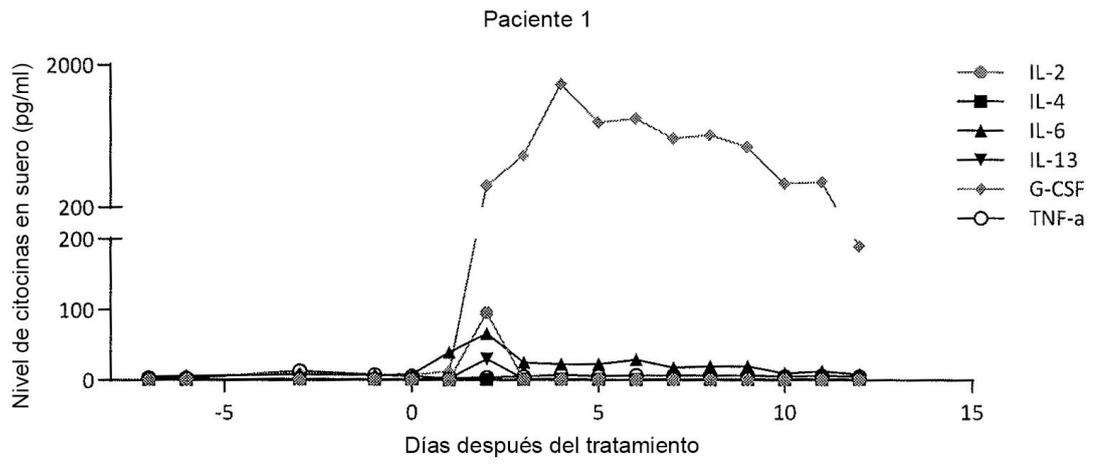


FIG. 16

A



B

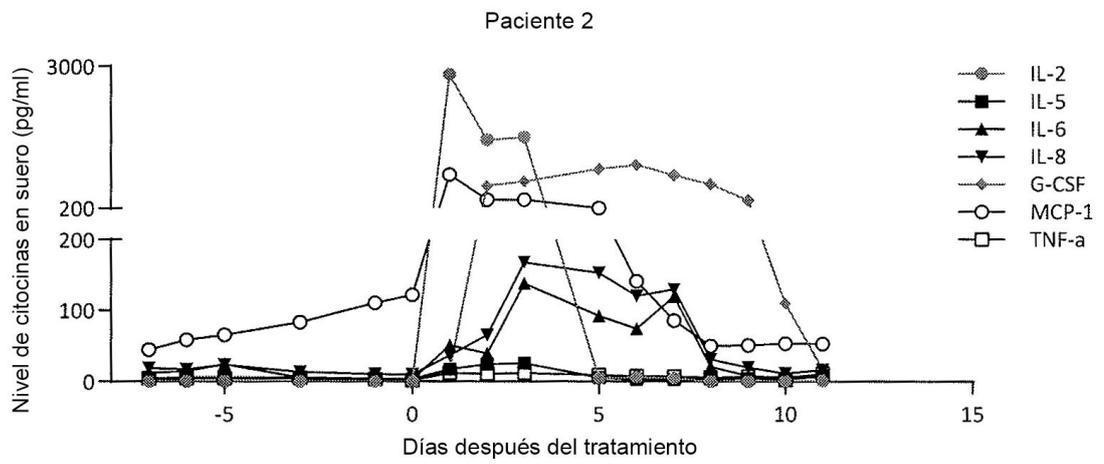


FIG. 17

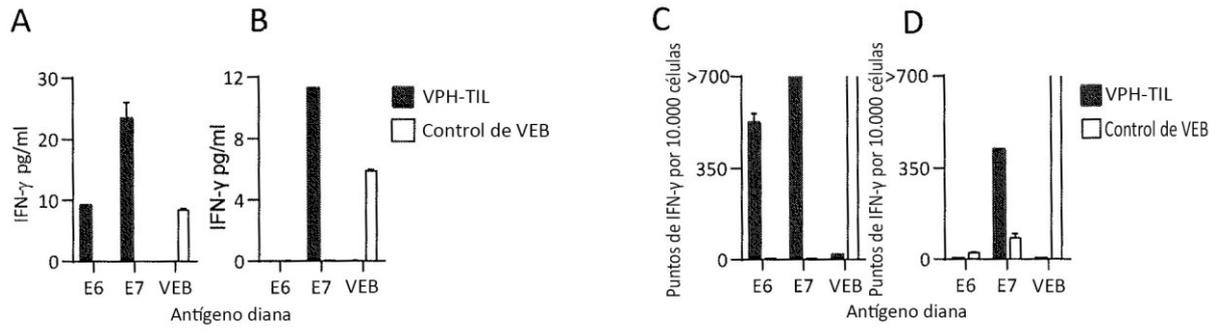


FIG. 18

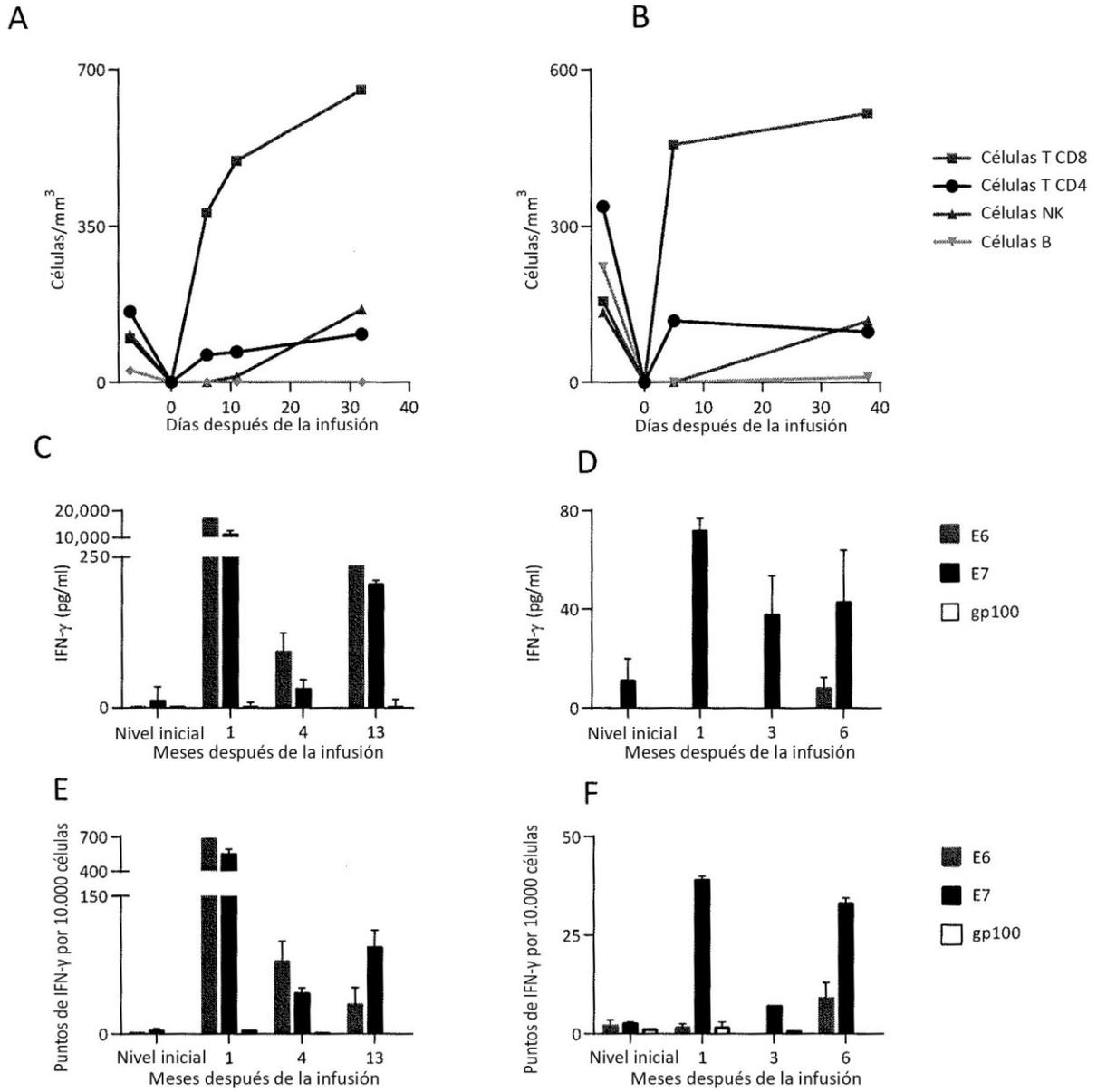


FIG. 19

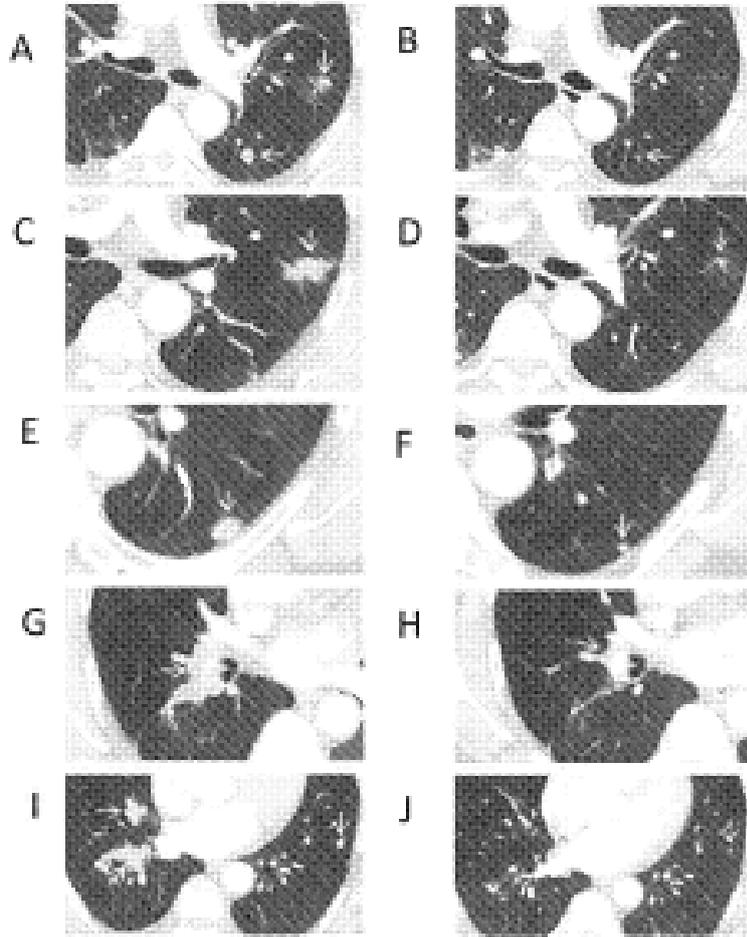


FIG. 20

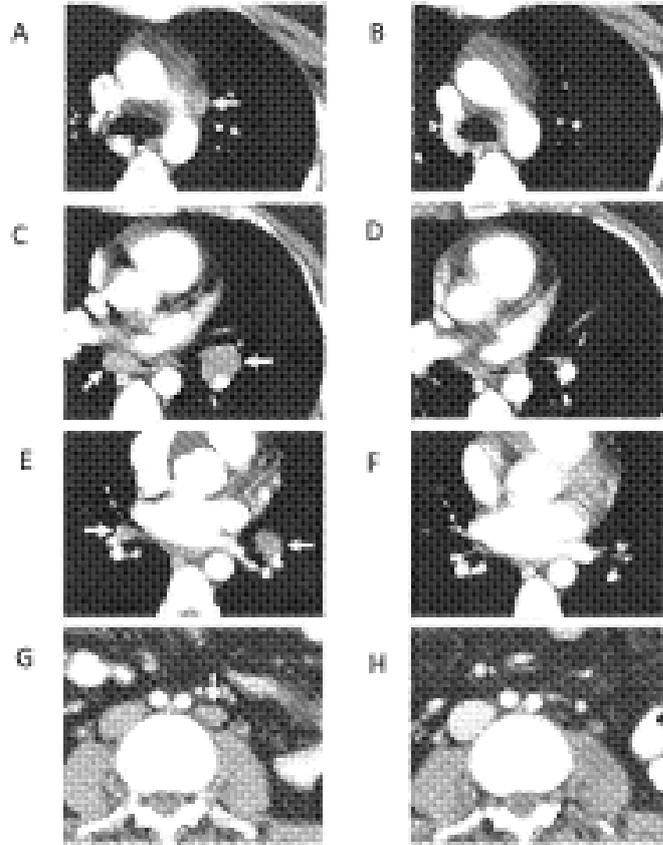


FIG. 21

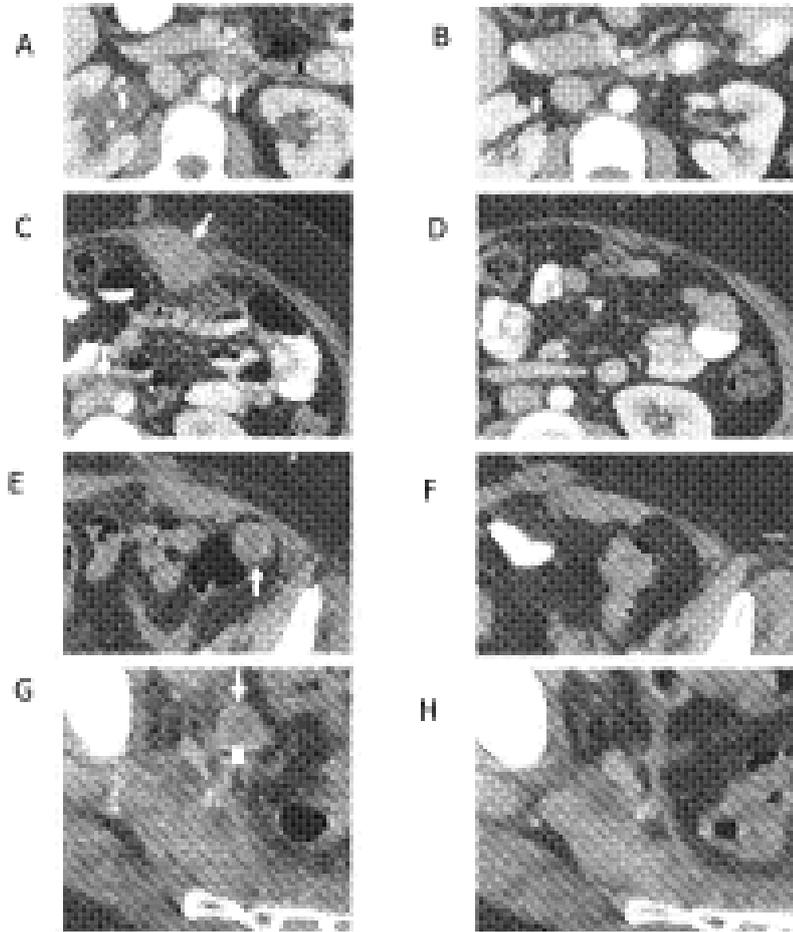


FIG. 22