

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 647**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2019** **PCT/GB2019/050570**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2019** **WO19166817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2019** **E 19710101 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2023** **EP 3759216**

54 Título: **Transducción y expansión celular**

30 Prioridad:

01.03.2018 GB 201803376

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2023

73 Titular/es:

**IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED
(100.0%)
Level 1 Faculty Building c/o Imperial College
Exhibition Road
London Middlesex SW7 2AZ, GB**

72 Inventor/es:

**KARADIMITRIS, ANASTASIOS y
ROTOLO, ANTONIA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 951 647 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).

DESCRIPCION

Transducción y expansión celular

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con métodos para transducir y expandir poblaciones de células.

- 5 Se divulgan, pero no forman parte de la invención, poblaciones de células que pueden producirse mediante los métodos de la invención. Las células producidas por los métodos de la invención y las composiciones farmacéuticas que las comprenden son adecuadas para su aplicación en uso médico y métodos de tratamiento, incluyendo la inmunoterapia.

Introducción

10 Células iNKT

Las células NKT invariantes (iNKT) son un subconjunto inmunorregulador y efector de las células T, que en humanos comprenden <0.1 % del número total de células T.

- 15 Existen varias diferencias estructurales y funcionales importantes entre las células iNKT y las células T convencionales (conT). Específicamente, las células iNKT expresan una cadena V α 24J α 18 invariable que casi siempre está emparejada con la misma cadena diversa TCRV β 11 (cadenas α y β de TCR diversas cf en células conT).

- 20 Las células iNKT también están restringidas por la molécula CD1d similar a HLA de clase I no polimórfica que presenta ligandos glico o fosfolípidos endógenos o exógenos a iTCR (en comparación con la restricción por moléculas MHC altamente polimórficas que presentan péptidos para células conT). Las células iNKT requieren la expresión de CD1d en timocitos para su selección y desarrollo (en comparación con el requisito de expresión de moléculas MHC en células tímicas epiteliales para la selección de células conT).

- 25 Las células iNKT se localizan en el sitio de la respuesta inmunitaria emergente en cuestión de horas, interactúan con las células presentadoras de antígenos que expresan CD1d y, después de su activación, modifican la respuesta inmunitaria emergente al potenciarla o suprimirla. Se ha demostrado que las células iNKT son necesarias para respuestas inmunitarias eficaces contra agentes infecciosos (bacterias, virus)⁶, en inmunidad antitumoral, en alo y autorreactividad y ateromatosis.

Papel de las células iNKT en la alorreactividad y en la respuesta inmune antitumoral

- 30 Varios estudios preclínicos demostraron la capacidad de las células iNKT de donantes transferidas adoptivamente para prevenir o incluso anular la enfermedad de injerto contra huésped aguda experimental establecida (aGVHD), un fenómeno alorreactivo que ocurre en el contexto del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. La aGVHD es impulsada principalmente por células T alorreactivas del donante activadas en respuesta a disparidades mayores o menores de antígenos de histocompatibilidad entre el donante y el receptor.

- 35 De acuerdo con la evidencia preclínica, varios estudios observacionales clínicos han demostrado que una dosis o frecuencia más alta de células iNKT del donante transferidas al receptor con el injerto de células madre de sangre periférica brinda una protección significativa contra la aGVHD sin comprometer el efecto injerto contra tumor. Mecánicamente, la protección contra aGVHD podría, al menos en parte, estar mediada por un efecto citotóxico directo de las células iNKT sobre las células presentadoras de antígenos que expresan CD1d alogénicas de una manera mediada por CD1d-iTCR e inmunoglobulina asesina activadora.

- 40 En modelos animales, se ha demostrado que las células iNKT mejoran las respuestas inmunitarias antitumorales, incluyendo las antilinfomas. En humanos, las células iNKT se alteran cuantitativa y cualitativamente en diferentes tipos de tumores, incluyendo los cánceres de la sangre tales como el mieloma múltiple, mientras que la infiltración del lecho tumoral por células iNKT parece conferir un pronóstico favorable en el cáncer colorrectal.

- 45 Gran parte del efecto antitumoral de las células iNKT depende de su capacidad para ser citolíticas directamente, a través de perforina/granzimas y otras vías de muerte celular contra tumores que expresan CD1d, o indirectamente, a través de su secreción de grandes cantidades de (interferón-gamma) IFN γ y activación secundaria de respuestas antitumorales dependientes de células T convencionales y también activación celular NK. En este sentido, la sustracción de CD4- de las células iNKT humanas expresa niveles más altos de perforina/granzimas e IFN γ (perfiles TH1) que sus equivalentes CD4+ que tienen un perfil IFN γ /IL-4 más equilibrado (TH0).

Receptores de antígenos quiméricos (CAR): estructura y aplicaciones clínicas

- 50 Los CAR son moléculas sintéticas que comprenden un ectodominio que funciona como un ligando de alta afinidad (la mayoría de las veces derivado de un anticuerpo y fabricado como un fragmento variable de cadena única, scFv) específico para un antígeno de superficie celular objetivo y un endodominio que asegura la activación y proliferación enérgicas de las células T modificadas de manera independiente de HLA. La configuración básica del endodominio

CAR comprende uno o dos dominios de moléculas coestimuladoras (derivados de CD28, 41-BB u OX-40) colocados junto con el dominio CD3z.

5 Basado en una actividad clínica y preclínica sin precedentes contra los cánceres de la sangre, las células T CAR contra el marcador de superficie de linaje B CD19 (células CAR19 T) ahora han sido autorizadas por la FDA para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de células B en niños y de los linfomas no Hodgkin B en adultos.

Desarrollo de la inmunoterapia celular CAR iNKT

Con base en las propiedades biológicas únicas y la promesa del poder antitumoral de la tecnología CAR, se ha investigado la hipótesis de que las células iNKT modificadas con CAR tendrían ventajas sobre las células T CAR convencionales.

10 Se ha descrito la prueba de principio de que las células iNKT modificadas con CAR son factibles, y las células CAR-iNKT muestran actividad antitumoral en modelos de ratón con xenoinjerto de neuroblastoma y linfoma. Sin embargo, la actividad preclínica *in vivo* y la eficacia de las células CAR-iNKT contra estos tipos de células tumorales requirieron la infusión de dosis repetidas de células CAR-iNKT o la administración parenteral simultánea de IL-2. Dado que la inmunoterapia T CAR convencional suele ser eficaz como una dosis única y sin el apoyo de IL-2, estos hallazgos
15 sugerirían que las células CAR iNKT son intrínsecamente inferiores a las células T CAR y muestran una aptitud física reducida *in vivo* o su rendimiento subóptimo *in vivo* refleja el proceso de fabricación particular empleado para su producción.

Los métodos empleados actualmente para producir poblaciones de células transducidas (tales como células iNKT transducidas) implican la expansión de una población de células antes de la transducción.

20 Resumen de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para transducir y expandir una población de células, comprendiendo el método, en orden:

- Un paso de selección de células iNKT;
- 25 • un paso de activación previa a la transducción;
- un paso de transducción celular para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR); y
- una fase de expansión celular;

en el que al menos el paso de transducción celular y la fase de expansión comprenden la incubación de las células iNKT con IL-15.

30 IL-15 también puede usarse opcionalmente en el paso de activación previa a la transducción.

Un método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención puede, además de los pasos y la fase enumerados anteriormente, comprender además uno o más pasos o fases adicionales, seleccionados independientemente del grupo que consiste en:

- un paso de enriquecimiento de linfocitos;
- 35 • un paso de selección de células transducidas;
- un paso de activación celular transducida; y
- una nueva fase de expansión celular.

De estos pasos o fases adicionales opcionales, el paso de enriquecimiento de linfocitos, si está presente, debe tener lugar antes del paso de selección de células. Si está presente, el paso de selección de células transducidas, el paso
40 de activación celular después de la transducción y la fase de expansión celular adicional deben tener lugar después de la fase de expansión celular.

Como se explica adicionalmente a lo largo de esta memoria descriptiva, los métodos de la invención son particularmente adecuados para su uso en la transducción y expansión celular iNKT. En una realización adecuada, un método de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención puede, además de los pasos y la fase enumerados
45 anteriormente, comprender además uno o más pasos o fases adicionales, seleccionados independientemente del grupo que consiste en:

- un paso de enriquecimiento de linfocitos;
- un paso de selección de células iNKT;
- un paso de selección de células iNKT transducidas;
- 50 • un paso transducido de activación celular iNKT y
- una fase adicional de expansión celular iNKT transducida.

Cada uno de los pasos adicionales de selección iNKT y activación posterior a la transducción, y la fase adicional de expansión celular, pueden comprender la incubación de las células con IL-15.

En consecuencia, en una realización adecuada, un método de la invención para usar en la transducción y expansión de una población de células iNKT puede comprender, en orden:

- 5 • un paso de enriquecimiento de linfocitos;
- un paso de selección de células iNKT;
- un paso de activación celular iNKT previa a la transducción;
- un paso de transducción de células iNKT;
- una primera fase de expansión celular iNKT transducida;
- 10 • un paso de selección de células iNKT transducidas;
- un paso de activación celular iNKT transducidas; y
- una fase adicional de expansión celular iNKT transducida.

En tal realización, el paso de transducción de células iNKT y la fase de expansión comprenden la incubación de las células con IL-15. De hecho, todos los pasos y fases desde el paso de activación previa a la transducción en adelante pueden llevarse a cabo en presencia de IL-15.

El método del primer aspecto de la invención puede proporcionar una población de células transducidas. Se apreciará que una población de células producida de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede comprender una proporción de células iNKT transducidas con CD4- que es mayor que la proporción de células iNKT transducidas con CD4- que pueden estar presentes en una población producida por un método en el que se expande una población de células iNKT, las células se transducen después de la expansión, en presencia de IL2. Un ejemplo de dicho método pueden ser los métodos descritos en la Solicitud de Patente Internacional publicada como WO 2013/040371A3 o en Tian, et al. (J Clin Invest. 2016;126(6): 2341-2355), o Heczey, et al. (Blood 2014; 124(18): 2824-2833).

Una población de células producida por un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede derivarse de una población inicial de células no transducidas, en la que:

- 25 • se transduce al menos 60% de las células;
- al menos 80% de las células son PD1 negativas; y

la proporción de células CD4- es al menos 70% de la proporción de células CD4- en la población inicial.

Las poblaciones de células transducidas producidas por el método del primer aspecto de la invención comprenden células transducidas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR).

30 Las poblaciones de células producidas por el método del primer aspecto de la invención son adecuadas para uso médico, por ejemplo, uso en inmunoterapia, como se describe más adelante.

Descripción de las figuras

La invención se ilustra adicionalmente mediante las Figuras adjuntas, en las que:

35 La Figura 1 ilustra un aumento en la eficiencia de transducción de los métodos de la invención (protocolo 3 y el protocolo optimizado 4) en comparación con otros protocolos que incluyen los protocolos conocidos en la técnica;

La Figura 2 ilustra un aumento en la eficiencia de transducción mostrado por gráficos completos de citometría de flujo de los métodos de la invención en comparación con los protocolos conocidos en la técnica;

La Figura 3 muestra una representación esquemática del protocolo optimizado;

40 La Figura 4 muestra gráficos de expansión celular iNKT de muestras de baja pureza (<80 %) en relación con el método de expansión;

La Figura 5 ilustra la transducción CAR de células iNKT seleccionadas por adelantado. El Panel A muestra gráficos de células iNKT transducidas tomadas de PBMC de un paciente con linfoma activo. El Panel B muestra gráficos de células iNKT transducidas tomadas de linfátesis de sangre periférica congelada de un individuo sano;

45 La Figura 6 ilustra la capacidad de expansión y la expansión a escala clínica de células CAR iNKT aisladas del producto de linfátesis congelado de donantes sanos;

La Figura 7 ilustra que las células CD4-CAR19iNKT expandidas están sesgadas por TH1 mientras que las células CD4+ CAR19iNKT están sesgadas por TH2;

50 La Figura 8 muestra un gráfico de citometría de flujo, que demuestra que las células K562 parentales no expresan CD1d o CD19, pero las células derivadas expresan CD1d y CD19 solas o en combinación. La figura también muestra un gráfico que ilustra la citotoxicidad dual y cooperativa de las células CAR19 iNKT;

La Figura 9 muestra un gráfico que ilustra que las células de la invención expresan niveles más bajos de marcadores de agotamiento que las contrapartes de células T convencionales transducidas para expresar CAR, cuando se evalúan mediante citometría de flujo;

La Figura 10 ilustra la actividad antilinfoma de las células CAR19 iNKT *in vivo*;

- 5 La Figura 11 ilustra la regresión del tumor cerebral en ratones tratados con CAR19 iNKT en comparación con ratones tratados con células CAR19T.

Figura 12. Protocolo optimizado para la generación de células CAR-iNKT polifuncionales, específicas de CD1d y CD19

- 10 a. Identificación por citometría de flujo de células iNKT como preselección TCRV α 24+V α 11+ y expresión de CAR19 de 2^{da} y 3^{ra} de generación en células TCRV α 24-T y TCRV α 24+ iNKT evaluadas mediante tinción frente al marcador RQR8 3 días después de la transducción lentiviral.
- b. Expansión y números absolutos de células CAR19-T y CAR19-iNKT durante 3 semanas usando linfagénesis (izquierda) o PB (derecha) (n=3 y 4 respectivamente). Los valores de P son para células CAR19-iNKT frente a CAR19-T utilizando la prueba de Friedman.
- 15 c. Expresión intracelular de citoquinas en reposo (n = 10) y en células anti-CD3/CD28-perla activadas (n = 6) CD4- y CD4+ CAR19-iNKT durante 4 horas. El análisis de citometría de flujo se realizó como se muestra en d. Los D-B48 y δ G9 mAbs identifican PFN total y asociado a gránulos. PFN: perforina; GZMB: granzima B; IFN γ : interferón- γ .
- d. Ejemplo representativo de análisis intracelular de citometría de flujo de citoquinas mostradas en células CD4-/CD4+ CAR19-T y CAR19-iNKT. En los diagramas de puntos de GZMB/IFN γ , la intensidad de la expresión de PFN se proyecta como un mapa de calor de acuerdo con la escala de colores que se muestra.
- 20 e. Proporción de células que coexpresan 0-3 citoquinas (n=4).
- f. Proporción de citoquinas específicas coexpresadas por células CD4-/CD4+ CAR19-T y CAR19-iNKT.
- g. Secreción múltiple de citoquinas después de 3 y 8 horas de activación de células CAR19-T y -iNKT de 2^{da} y 3^{ra} (2 y 3) generación de 2 donantes sanos (A y B). El mapa de calor muestra relaciones de células CAR19-iNKT/CAR19-T normalizadas.
- 25 h. Actividad citotóxica de 2^{da} generación de células CAR19-iNKT contra células parentales CD1d-19-K562 o células K562 que expresan CD1d y CD19 individualmente o en combinación en las proporciones indicadas de efector a célula objetivo (E/T) (representativas de 3 experimentos).

*: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001; ****: p<0.0001

Figura 13 (Relacionada con la Fig. 12)

- 30 a. Construcción lentiviral (izquierda) y estructura modular (derecha) de CAR19 de 2^{da} y 3^{ra} generación utilizada en este estudio. RQR8 se coexpresa con CAR después de la escisión postraduccional del péptido FMD2A. TM: transmembrana
- b. Gráficos de puntos representativos que ilustran los diferentes pasos de selección, expansión y transducción CAR de células iNKT en los 4 protocolos diferentes explorados (protocolos 1-4). La expresión de CAR aquí se identifica por tinción anti-F(ab)2.
- 35 c. Datos acumulativos que muestran la eficiencia de transducción de CAR de las células iNKT de acuerdo con cada protocolo (protocolos 1-4).
- d. Ejemplo de generación de células CAR19-iNKT de un paciente con linfoma activo utilizando el protocolo 4. El 82% de PBMC corresponden a células de linfoma CD19+.
- 40 e. Ejemplo representativo de la conservación de la frecuencia de las células CD4-iNKT antes (paneles de gráficos de puntos superiores) y después (paneles central e inferior) de la transducción de CAR de acuerdo con los protocolos 2 frente a 4.
- f. Datos acumulativos que muestran la expresión de citoquinas intracelulares por células CD4-/CD4+ CAR19-iNKT después de la estimulación de células C1R-CD1d durante 4 horas. IFN γ : interferón- γ .
- 45 Figura 14 (Relacionada con la Fig. 12)
- a. Gráficos de puntos que muestran la expresión de CD19 y CD1d en células K562 parentales y derivadas después de la transducción retroviral de los ADNc correspondientes.

b. Actividad citotóxica de 2^{da} generación de células CAR19-iNKT contra células parentales CD19-CD1d-K562 o células K562 que expresan CD19 y CD1d individualmente o en combinación con y sin pulsación previa de objetivos con 100 ng/ml de α -GalCer. Las proporciones de células efectoras a objetivo (E/T) son como se muestran (representativas de 2 experimentos).

5 Figura 15. Reactividad mejorada a corto y largo plazo de las células CAR19-iNKT contra las neoplasias malignas de linaje B

a. expansión celular CAR19-T y CAR19-iNKT de 2^{da} y 3^{ra} generación (cambio de plegamiento) y números absolutos de células durante un período de 3 semanas (n = 4). El valor de p es para células CAR19-iNKT frente a CAR19-T utilizando la prueba de Friedman.

10 b. Análisis de proliferación mediante visualización Incucyte en tiempo real de células CAR19 - T e -iNKT de 2^{da} y 3^{ra} generación en presencia (estimuladas) o no (en reposo) de células CD1d+CD19+ (C1R-CD1d) irradiadas durante 7 días. El valor de p es para células CAR19-iNKT frente a CAR19-T utilizando la prueba de Friedman.

c. Citotoxicidad de células CAR19-T y -NKT 3^{ra} generación frente a líneas celulares de linfoma C1R-CD1d y Farage precargadas o no con α -GalCer.

15 d. Imágenes de Incucyte de pocillos representativos que muestran el efector final (gris) y las células objetivo vivas (rojo o) después de 7 días. Los efectores fueron células CAR19-T y - CAR19-NKT de 2^{da} generación. Los objetivos fueron células ARH-77-CD1d marcadas con proteína fluorescente roja mCereza.

e. Trayectoria de siete días de proliferación y eliminación de células efectoras y objetivo respectivamente según d. El valor de p es para células CAR19-iNKT frente a CAR19-T utilizando la prueba de Friedman.

20 f. Citotoxicidad de células CAR19-iNKT, CAR19-T y de iNKT no transducidas de 2^{da} contra células de linfoma de 1 paciente con MCL (arriba) y 2 pacientes con linfoma MZB (abajo) utilizando 3 donantes sanos de células T/iNKT diferentes.

cc: confluencia celular; FP: proteína fluorescente; RCU: unidades calibradas en rojo.

Figura 16 (Relacionada con la Fig. 15)

25 a. Actividad citotóxica de células CAR19-iNKT (derecha) contra células C1R con niveles altos y bajos de expresión de CD19 (izquierda). La línea celular de mieloma de linaje B KMS12BM se utilizó como control de CD19.

b. Actividad citotóxica de células CAR19-iNKT (derecha) contra células ARH77 que expresan niveles bajos o altos de CD1d exógeno (izquierda); la línea celular de mieloma de linaje B H929 se utilizó como control de CD1d.

Figura 17 (Relacionada con la Fig. 15)

30 a. Análisis de citometría de flujo de la coexpresión de CD19 y CD1d en células de linfoma de 1 paciente con variante blástica de MCL (arriba) y 2 pacientes con linfoma MZL con PB y afectación de la médula ósea (centro y parte inferior). En los paneles de la izquierda, las células malignas están enmarcadas con la expresión de CD1d que se muestra como un mapa de calor en gráficos de puntos de CD5/CD19 y se colorean de acuerdo con la intensidad de la expresión en los paneles del medio. Los paneles de la derecha muestran la expresión de CD1d en forma de histogramas. Tenga en cuenta la presencia de 2 poblaciones de linfoma diferentes con diferentes niveles de expresión de CD1d en el paciente 1.

35 b. Estrategia de selección del ensayo de citotoxicidad por citometría de flujo para el análisis en "el mismo tubo" de células de linfoma (violeta+, CD19+CD3/56/11b/14/16-, SCA^{bajo}) y monocitos (violeta+, CD3/56/11b/14/16+, SCA^{alto}). Las células muertas se identificaron como eventos 7-AAD+, con una intensidad alta e intermedia de 7-AAD correspondiente a células necróticas y apoptóticas respectivamente.²¹ La muerte celular también se evaluó por tamaño celular (FSC-A) con células más pequeñas correspondientes a células apoptóticas/necróticas. (véase también métodos).

c. Histogramas de citometría de flujo que muestran el análisis del tamaño celular basado en FSC-A de células objetivo de linfoma primario en ensayos de citotoxicidad con CAR19-iNKT, CAR19-T y células iNKT no transducidas.

45 d. Fracción de células de linfoma primario 7-AAD^{alto} y 7-AAD^{tenue} en ensayos de citotoxicidad con CAR19-iNKT, CAR19-T y células iNKT no transducidas.

e. Actividad citotóxica de CAR19-iNKT, CAR19-T y células iNKT no transducidas contra monocitos en los ensayos que se muestran en la Fig. 15f y la Fig. 17c-d.

Figura 18. Base epigenética para mejorar la reactividad de las células CAR-iNKT

a. Cuantificación de CD1d mRNA por qPCR en células de CLL de 2 pacientes con tratamiento ATRA (10^{-6} M) durante 0-96 horas.

b & c. Histogramas de citometría de flujo que muestran la expresión de CD1d en células B malignas tras el tratamiento con ATRA y el análisis de intensidad fluorescente media (MFI) de la expresión de CD1d en comparación con el control de isotipo.

d. Citotoxicidad de células CAR19-T y -NKT de 2^{da} y 3^{ra} generación de contra células CLL pulsadas con α -GalCer (Fig. 19g) pretratadas con control de DMSO al 0,1% o 10^{-6} M ATRA.

e. Ensayo ChIP-qPCR para el enriquecimiento de H3K4me3 y H3K27me3 en el promotor de *CD1D* usando IgG como control en células U266. *GAPDH* es un control génico activo, mientras que *HOXA2* es un control de genes reprimidos. Los datos de ChIP se muestran como un porcentaje de la cromatina de entrada.

f. Ensayo de qPCR secuencial reChIP que muestra el enriquecimiento de plegamiento de H3K27me3 o el control de IgG después de IP contra H3K4me3.

g. Ensayo ChIP-qPCR contra RNA PolII para forma fosforilada Ser5 sobre Ser2 en el promotor de *CD1D*.

h. Ensayo ChIP-qPCR contra RAR α , EZH2 y control de Ig en los promotores de los genes mostrados. i. Ensayo ChIP-reChIP qPCR que muestra el enriquecimiento de EZH2 o control IgG después de IP contra RAR α en células U266 (para e-i: n=3)

j. Cuantificación qPCR de CD1d mRNA en células U266 tratadas con DMSO al 0,1 %, 10^{-6} M GSK343, 10^{-6} M ATRA o 10^{-6} M GSK343 más 10^{-6} M ATRA. Los valores se normalizan a niveles de expresión de CD1d mRNA en células B de sangre periférica normal (n=3).

k & l. Análisis de MFI relativo y descripción del histograma de la expresión de CD1d en comparación con el control de isotipo en células U266 del mismo experimento que se muestra en j.

Figura 19 (Relacionada con la Fig. 18)

a. Expresión baja o nula de CD1d en células de CLL de pacientes UPN1 y 2 en comparación con las células B normales. Las células CLL B de sangre periférica son CD19+CD5+, mientras que las células B no malignas son CD19+CD5-. La expresión de CD1d se muestra como un mapa de calor en gráficos de puntos de CD19/CD5 y como superposiciones de histogramas.

b. Actividad citotóxica de células CAR19-iNKT de 2^{da} generación contra células CLL en presencia de control DMSO o α -GalCer (derecha). El nivel de expresión de CD1d en células CLL también se muestra mediante un mapa de colores en un diagrama de puntos y un análisis de histograma (izquierda).

c. Análisis de diagrama de puntos y mapa de calor combinado de la expresión de CD1d en células CLL tratadas con 10^{-6} M ATRA para 0-96 horas.

d. Aumento relativo de ARNm de CD1d evaluado mediante la expresión de qPCR en células CLL tratadas con DMSO al 0.1 % o 10^{-6} M ATRA por 0 o 48hrs (n=4 pacientes).

e. Aumento relativo de la expresión superficial de CD1d según lo evaluado por la relación CD1d/isotipo como se describe en d (n=5).

f. Ningún efecto de ATRA sobre la viabilidad de las células de CLL según lo evaluado mediante la tinción con azul de tripano.

g. Análisis de diagrama de puntos combinado con mapa de calor de la expresión de CD1d en células de CLL tratadas con DMSO al 0.1 % o 10^{-6} M ATRA durante 48 horas y posteriormente se usó para probar la reactividad de los efectores CAR19 de 2^{da} y 3^{ra} generación en el ensayo de citotoxicidad que se muestra en la Fig. 18d.

h. Expresión de CD1d en U266 en comparación con células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos. Izquierda: niveles relativos de ARNm evaluados por qPCR (n=3); Derecha: Histogramas de citometría de flujo representativos que muestran la intensidad fluorescente media (MFI) de CD1d en células U266 en comparación con las células B de sangre normal y los monocitos en relación con los controles de isotipo. ND: no detectado.

i. Ensayo ChIP-qPCR que muestra el estado de histona bivalente de *CD1D* en células CLL primarias de los mismos 2 pacientes que se muestran en la Fig. 18 a-c y la Fig. 19c. Hubo enriquecimiento relativo para las marcas H3K4m3 y H3K27m3 en relación con el control de Ig. Los 3 amplicones de qPCR que abarcan la UTR 5' (DP: distal; PP: proximal, en relación con el codón de inicio ATG) y el cuerpo del gen (i2P: dentro del exón 2) de *CD1D* se muestran. Representante de 2 experimentos independientes.

Figura 20. Actividad antitumoral *in vivo* mejorada de las células CAR19-iNKT

- a. Diseño del experimento *in vivo*. Se transfirieron vía iv 5×10^6 células C1R-CD1d que expresan luciferasa a ratones NSG. El crecimiento tumoral fue monitorizado por bioluminiscencia (BLI). Después de que se confirmó el injerto aumentando la actividad de los fotones en 2 escaneos BLI consecutivos tomados con al menos 72 horas de diferencia, 10^7 células efectoras (o el mismo volumen de control de PBS) se transfirieron por vía iv seguido de un control BLI de la carga tumoral en el programa que se muestra.
- b & c. Supervivencia general y libre de tumores de ratones con tumores no tratados (n=12) o tratados con células T no transducidas (n=7), células iNKT no transducidas (n=7), células CAR19-T de 2^{da} generación (n=19) o células CAR19-iNKT (n=19). Los datos son de 2 experimentos independientes. Los valores de P mostrados son para la comparación de animales tratados con células CAR19-T frente a CAR19-iNKT.
- d. Ejemplos representativos de vistas BLI ventral y dorsal de la carga tumoral en los días -1 (pretratamiento) y +3 (postratamiento) de la misma cohorte de ratones que se muestra en e.
- e. Datos acumulativos según d de 1 cohorte de ratones que muestran carga tumoral evaluada por BLI luminosidad en los días -1 y +3.
- f. Actividad de fotones en la cabeza de control (n = 11), animales tratados con células CAR19-T (n = 18) y CAR19-iNKT (n = 18) en el injerto y al finalizar el experimento. El umbral de detección (línea de puntos) se estableció como el valor de actividad de BLI más bajo registrado en la cabeza en el injerto en toda la cohorte de animales utilizados.
- g. La actividad de BLI se registró a lo largo de la duración del experimento en los grupos de control solo de tumor, tratados con CAR19-T e -iNKT. 2^{da} remisión se logró en 4 animales que recibieron inmunoterapia con CAR19-iNKT, pero en ninguno dentro de los otros grupos.
- h. Ejemplo representativo de 2^{da} remisión de la enfermedad recidivante basada en el cerebro en un animal tratado con células CAR19-iNKT.
- itx: inmunoterapia. § En 4 y 7 animales tratados con CART y CARiNKT respectivamente, la carga tumoral no pudo ser monitorizada por BLI desde el día 70 (+59 post itx) debido al acceso restringido al instrumento IVIS. Sin embargo, todos los ratones se mantuvieron en el estudio hasta el logro del punto final de supervivencia o el final del experimento.

Figura 21 (Relacionada con la Fig. 20)

- a. Correlación de la señal BLI con el estudio de resonancia magnética cerebral en un animal tratado con células CAR19-T. *Izquierda*: Imágenes BLI obtenidas el día +21 después de la inmunoterapia. *Derecha*: Secciones representativas de IRM sagital, axial y coronal de ratón (m) obtenidas el día +23 después de la inmunoterapia después de la inyección de contraste (Gadovist 3mmol/kg iv) y adquiridas con secuencia T1 FLASH para maximizar la señal de gadolinio. La sustancia blanca normal es oscura, la captación aberrante de gadolinio es brillante. El estudio de IRM terminal mostró una masa selar de 21.400 mm³ (± 0.200) y áreas de realce periselares e isocorticales, sugestivas de crecimiento linfomatoso en la región selar e infiltración del tejido cerebral por células tumorales.
- b. Correlación de imágenes BLI con estudio de resonancia magnética cerebral en un animal tratado con células iNKT. El animal dejó de ganar peso a partir del día +36 post-inmunoterapia. El estudio de IRM longitudinal mostró una masa en constante crecimiento en la región pituitaria, con un volumen estimado de 4.720 mm³, 7.790 mm³ y 28.200 mm³ en el día +37 (arriba), +43 (medio) y +51 (abajo) respectivamente. Finalmente, el ratón se volvió hipoactivo, lo que se asoció con la aparición de un realce extraaxial superficial adyacente a la corteza cerebral, lo que sugiere una infiltración meníngea por células tumorales.
- c. Correlación de imágenes BLI con espectroscopia IRM (MRS). Estudio longitudinal de IRM y MRS en un animal tratado con células CAR-T. Arriba: La evaluación de MRS en el día +63 posterior a la inmunoterapia apoyó la enfermedad de cabeza de carga baja, que en la evaluación de MRS se caracterizó por la inversión de Colina/Creatina (frecuencia: 3.2/3.0) y Colina/NAA (frecuencia: 3.2/2.0) picos en LTE en comparación con el control normal (Tabla 4). Abajo: La progresión de la enfermedad de la cabeza fue confirmada por BLI, IRM y MRS el día +78, mostrando un aumento de la señal bioluminiscente de la cabeza, masa selar agrandada (de 6.382 mm³ ± 0.235 a 7.429 ± 0.033) y proporciones más altas de Colina/Creatina y Colina/NAA. Los datos de MRS se muestran como cambios químicos expresados en partes por millón (ppm) en relación con el tetrametilsilano de referencia (TMS, frecuencia 0.00 ppm).
- d. Correlación de imágenes BLI con inmunohistoquímica. Ejemplo representativo de tinción con CD19 antihumano (hCD19) y CD3 (hCD3) de tejido cerebral del bulbo olfatorio de un ratón tratado con células CAR19-T. Las células tumorales se identificaron mediante tinción brillante con CD19, mientras que las células CAR19-T se revelaron mediante tinción con CD3+ en el borde de las áreas tumorales.

Figura 22 (Relacionado con la Fig. 20).

a-d. Remisión secundaria en animales tratados con células CAR19-iNKT. Se muestran imágenes BLI longitudinales y la dinámica de la actividad de radiación para cada animal. La recaída ocurrió entre los días 17 y 26 después de la

inmunoterapia. En 3 ratones, BLI documentó una segunda remisión completa. En el 4^{to} ratón se pudo documentar una remisión parcial, debido al acceso restringido al instrumento IVIS desde el día 70 (+59 post itx) (§). Sin embargo, todos los ratones sobrevivieron hasta el final del experimento sin signos clínicos de progresión tumoral evaluados post mortem mediante imágenes de fluorescencia, citometría de flujo o inmunohistoquímica (no se muestra). ND: no detectable.

Descripción detallada de la invención

Los métodos del primer aspecto de la invención son útiles para transducir y expandir una población de células, en los que la transducción introduce ácidos nucleicos que codifican un CAR en las células transducidas. Tal CAR es capaz de conferir especificidad de unión y actividad biológica a las células que se han transducido así, y también a su progenie. Los métodos del primer aspecto de la invención son particularmente útiles en la transducción de células iNKT.

El lector experto reconocerá que los inventores han demostrado que los métodos de acuerdo con el primer aspecto de la invención permiten la transducción y expansión exitosas de tipos de células raras que constituyen una pequeña proporción de la población de células total. Tales células raras han sido con frecuencia difíciles de transducir y expandir utilizando protocolos de la técnica anterior.

Los métodos de la invención hacen uso de un paso de selección celular, un paso de activación previa a la transducción, un paso de transducción y una fase de expansión celular. A diferencia de los métodos convencionales de transducción y expansión de poblaciones de las PBMC (tales como células T), los métodos de la invención emplean el paso de transducción antes de la fase de expansión. De hecho, los métodos de la invención carecen de una fase de expansión celular previa a la transducción.

Además, al menos el paso de transducción y la fase de expansión de los métodos de la invención implican la incubación de las células con IL-15. Esto difiere de los enfoques publicados anteriormente para la transducción de células iNKT, en los que se ha empleado IL-2.

Estas diferencias, junto con las diferencias proporcionadas por diversas otras realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, proporcionan una serie de propiedades inesperadas y ventajosas. Estos pueden observarse tanto en términos de la práctica de los métodos como en términos de las propiedades de las células producidas.

Simplemente a modo de ejemplo, los métodos de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en virtud de emplear el paso de transducción antes de la fase de expansión, implican la transducción de un número mucho menor de células. Los inventores han descubierto que los métodos de la invención pueden llevarse a cabo con éxito en tan solo 10,000 células, tal como las células iNKT. Estas células se pueden proporcionar a una concentración de alrededor de 5000 células por mililitro. Este enfoque, en el que se transducen números más pequeños de células, permite el uso de cantidades más pequeñas de reactivos de transducción que incluyen cantidades más pequeñas de virus transductores, lo que da lugar a un ahorro considerable de costes. Los costes de fabricación reducidos que pueden lograrse utilizando los métodos de la invención representan una ventaja significativa y superan los inconvenientes reconocidos de las técnicas publicadas anteriormente.

Los inventores han demostrado que los métodos de la invención no solo reducen los costes de fabricación, sino que también ofrecen ventajas sorprendentes porque permiten que se consigan eficacias de transducción superiores al 60% de forma reproducible. Esto tiene una importancia considerable, ya que los tipos de células tal como las células iNKT han demostrado ser difíciles de transducir con eficacia. De hecho, los propios experimentos de los inventores utilizando técnicas previamente publicadas han logrado, en promedio, eficiencias de transducción por debajo del 40%. Por el contrario, los métodos de la invención pueden lograr una eficiencia de transducción media en células iNKT del 75%.

Los métodos de la invención no solo son más baratos y sorprendentemente eficientes, sino que también permiten la transducción y expansión exitosas de células iNKT de fuentes que anteriormente han sido difíciles de usar. Por ejemplo, los inventores han demostrado que los métodos de acuerdo con el primer aspecto de la invención pueden transducir y expandir con éxito no solo células recién obtenidas, sino también células que se han congelado previamente. La capacidad de transducir y expandir con éxito poblaciones de células a partir de muestras congeladas no se ha demostrado previamente con respecto a las células iNKT.

Otra ventaja de los métodos de la invención radica en ampliar la gama de individuos de los que se pueden obtener células para transducir y expandir. Las técnicas anteriores se han basado en gran medida en donantes sanos. De hecho, tales individuos son los únicos tipos de donantes a partir de los cuales se han transducido y expandido con éxito células iNKT. Por el contrario, los inventores han demostrado que los métodos de la invención también pueden permitir la transducción y expansión satisfactorias de poblaciones celulares extraídas de donantes con cánceres activos, tales como el linfoma. Se apreciará que la capacidad de usar con éxito estas fuentes de células amplía las opciones disponibles para los médicos que deseen usar células transducidas, tales como las células CAR-iNKT terapéuticamente. En particular, esto facilita el uso de células autólogas para la terapia del cáncer, lo que no ha sido posible anteriormente con respecto a las células iNKT.

Estos métodos de la invención permiten la producción de poblaciones de células que presentan una combinación ventajosa de características (particularmente en términos de su eficiencia de transducción, la proporción de células CD4⁺ conservadas, y menor expresión del marcador de agotamiento PD1), que no ha sido posible conseguir previamente utilizando los métodos conocidos en el estado de la técnica. Así, las poblaciones de células producidas por los métodos de la invención pueden distinguirse de las descritas anteriormente. Estas poblaciones de células dan lugar al segundo aspecto de la invención, que se refiere a poblaciones de células que tienen propiedades ventajosas del tipo conferido por los métodos de la invención.

Las poblaciones de células pueden exhibir expresión del marcador de agotamiento de células T de superficie PD1 en menos del 20 % de las células transducidas producidas (según se evaluó 23 días después de la transducción de CAR). Esta falta de marcadores de agotamiento indica que las células de la invención permanecen sin agotarse incluso después del proceso de transducción y expansión.

Además, las células de la invención, tal como las producidas por los métodos del primer aspecto de la invención, demuestran una serie de características deseables adicionales.

Como se ha expuesto anteriormente, la eficacia de transducción de los métodos de la invención permite generar poblaciones de células en las que una proporción muy elevada expresa los productos de los ácidos nucleicos transducidos, tales como los CAR.

Los métodos de la invención no solo generan eficientemente células que expresan CAR. Las células CAR-iNKT generadas también demuestran actividad citolítica cooperativa entre el iTCR y el CAR transducido. Como se muestra adicionalmente en los Ejemplos, las células CAR-iNKT de la invención demuestran una reactividad cooperativa contra las células que coexpresan CD1d (reconocido por el receptor iTCR de las células iNKT) y el CAR objetivo. Esta actividad no se ha demostrado directamente con respecto a las células CAR iNKT producidas mediante métodos publicados previamente. Además, las poblaciones de células de acuerdo con la invención (tal como las producidas por los métodos de la invención) también tienen propiedades que ofrecen otros beneficios en un contexto clínico. En particular, la fracción CD4⁻ de las células CAR iNKT está bien conservada en las poblaciones de células producidas por los métodos de la invención.

Como apreciará el lector experto, esto es importante, ya que las células CD4⁻ iNKT tienen una polarización similar a TH1, una característica que es importante para las respuestas inmunitarias antitumorales, debido a su mayor actividad citolítica en comparación con células TH0 CD4⁺ iNKT. Además, el trabajo publicado ha demostrado que CD4⁻, y no CD4⁺, las células iNKT confieren protección contra la enfermedad aguda de injerto contra huésped en humanos. Esto es importante y pertinente para el uso potencial de las células iNKT, incluyendo la inmunoterapia basada en CAR, utilizando donantes como fuente de células iNKT.

Por lo tanto, las células producidas por los métodos del primer aspecto de la invención tienen propiedades que las hacen muy adecuadas para usos terapéuticos, tal como en la inmunoterapia basada en células.

Esto se demuestra mediante los resultados, informados en los Ejemplos, que se lograron en un modelo de tumor de xenoinjerto de linfoma usando ratones NSG. Las células CAR-iNKT generadas por los métodos del primer aspecto de la invención se inyectaron una vez en ratones portadores de linfoma. Este tratamiento dio como resultado una mejora significativa en la supervivencia general y libre de tumores, en comparación con los animales no tratados o los animales que recibieron uno de varios tratamientos experimentales comparativos (células CAR-T, células iNKT no transducidas o células T no transducidas).

Esta única inyección de células CAR-iNKT de la invención condujo a una regresión sostenida del tumor y, en algunos casos, a una segunda remisión, incluso después de una recaída cerebral. Más del 70 % de los ratones tratados tuvieron una supervivencia general libre de tumores de al menos 3 meses. Estos resultados indican claramente que las células de la invención mantienen funciones efectoras intactas y ejercen una inmunovigilancia eficaz a largo plazo *in vivo*. Además, dado que no se administraron citoquinas exógenas a los ratones que recibieron las células de la invención, esto indica que estas células son capaces de extender persistencia *in vivo*. De hecho, los resultados obtenidos indican tanto la persistencia a largo plazo como la capacidad de las células para generar respuestas secundarias contra el linfoma.

Los métodos de la invención pueden conferir algunos o todos los beneficios mencionados en relación con el Ejemplo 1 (discutido más adelante). En particular, tales métodos de la invención pueden conferir algunos o todos de:

- Las ventajas proporcionadas por la transducción inicial;
- Las ventajas obtenidas por la activación celular iNKT que tiene lugar antes de la transducción;
- Los beneficios asociados con el uso de IL-15, a diferencia de IL-2;
- Las ventajas descritas con respecto a la selección del material de partida y las condiciones de cultivo celular;
- El beneficio de preservar la fracción de células iNKT que está más polarizada a TH1;
- La ventaja de la reactividad dual tanto para CD1d como para el objetivo CAR;
- La ventaja de producir poblaciones celulares con agotamiento reducido y expresar marcadores de agotamiento reducido;

- La ventajosa actividad antitumoral in vivo observada; y
- La ventajosa persistencia in vivo observada con respecto a las células CAR iNKT.

Definiciones

5 Con el fin de facilitar la comprensión de la invención, se explicarán ahora con más detalle diversos términos utilizados en la descripción y definición de la invención, con referencia a los siguientes párrafos.

Métodos del primer aspecto de la invención (métodos de "hacer" células)

10 El primer aspecto de la invención proporciona métodos que pueden usarse para transducir y expandir una población de células iNKT. Los métodos comprenden un paso de selección de células, un paso de activación previa a la transducción, seguido de un paso de transducción y una fase de expansión posterior a la transducción. El paso de transducción precede a la fase de expansión.

15 Como se mencionó anteriormente, este uso de un paso de transducción que involucra un número relativamente pequeño de células antes de la fase de expansión en los métodos de la invención es una desviación del enfoque que normalmente se toma en la transducción de PBMC, donde la transducción se realiza en un muy gran número de células (ya sea en virtud del uso de tipos de células muy abundantes o de la expansión del número de células antes de la transducción). Los inventores han encontrado que su adaptación de métodos estándar para realizar la transducción antes de la expansión celular ofrece ventajas notables, como se discute a lo largo de la presente divulgación.

20 Al menos el paso de transducción celular y la fase de expansión celular tienen lugar en presencia de IL-15. Como se analiza más adelante, la incubación con IL-15 también puede usarse en realizaciones adecuadas del paso de activación previa a la transducción.

Tiempos de pasos y fases

25 Los métodos de la invención se pueden poner en práctica utilizando células recién recogidas o células previamente congeladas. Los tiempos a continuación son aplicables a células frescas o descongeladas. En el caso de células frescas, los tiempos deben calcularse desde el momento en que se recogieron las células. En el caso de células previamente congeladas, los tiempos se calculan a partir del momento en que se descongelan las células.

Se puede realizar un paso de enriquecimiento de linfocitos dentro de las 24 horas posteriores a la recolección o descongelación.

30 Un paso de selección de células iNKT se puede realizar inmediatamente después de completar un paso anterior, o inmediatamente después de la recolección o descongelación en el caso de que constituya el primer paso del método reivindicado.

El paso de activación previa a la transducción se puede realizar poco después de completar el paso de selección de células. Por ejemplo, el paso de activación previa a la transducción se puede realizar dentro de las dos horas posteriores a la finalización del paso de selección de células, o dentro de la hora posterior a la finalización del paso de selección de células.

35 El paso de transducción de células se puede realizar dentro de las 24-36 horas desde el final del paso de selección de células.

40 La fase de expansión celular puede comenzar inmediatamente después de que se complete el paso de transducción celular. Adecuadamente, la fase de expansión celular puede tener una duración de entre 5 y 7 días (si se va a emplear un paso de activación celular transducida), o de alrededor de tres semanas, en realizaciones sin un paso de activación celular transducida.

En el caso de que se vaya a utilizar un paso de selección de células transducidas, debe emplearse inmediatamente después de completar la fase inicial de expansión celular.

Puede emplearse un paso de activación celular transducidas siempre que la proliferación celular se ralentice o se detenga.

45 Una fase adicional de expansión celular transducidas puede comenzar tan pronto como se haya completado el paso de activación celular transducidas. Convenientemente, una fase adicional de expansión celular transducida puede tener una duración de alrededor de 2 semanas.

Células que van a ser transducidas y expandidas.

50 Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo utilizando cualquier célula biológica que se desee transducir y ampliar su número. Los ejemplos de tipos y fuentes adecuados de dichas células se analizan más adelante.

Las células pueden ser células adecuadas para su uso en inmunoterapia, particularmente inmunoterapia basada en células. Una célula adecuada puede ser capaz de ejercer una respuesta inmunitaria mediada por células. Esta respuesta puede ejercerse sobre la unión de una molécula objetivo.

5 Por ejemplo, una célula adecuada puede ser capaz de ejercer actividad citocida, por ejemplo, mediante acción citotóxica, o induciendo una lisis celular específica. Se apreciará que las PBMC, y particularmente las células T tales como las células iNKT, son muy adecuadas para usos médicos, tal como en inmunoterapia (como se considera en el sexto aspecto de la invención). El uso de las células de la invención de esta manera se considera con más detalle en otra parte de la presente memoria descriptiva.

10 Una célula adecuada también puede proliferar en respuesta a la unión a una molécula objetivo. Las moléculas objetivo y los medios, tales como los receptores celulares, por los que pueden unirse, se describen con más detalle a continuación.

Se apreciará que estas diversas respuestas biológicas, tales como la actividad citocida y la proliferación, están todas asociadas con la activación de las células T, tales como las células iNKT.

15 Las células iNKT adecuadas pueden mostrar una reactividad cooperativa, en la que la activación se produce después de la unión a dos moléculas objetivo (tal como un objetivo para CAR y CD1d) expresadas por una célula diana. Por consiguiente, una célula adecuada puede ser capaz de una reactividad cooperativa en respuesta a al menos dos moléculas objetivo.

Convenientemente, las células iNKT usadas en los métodos del primer aspecto de la invención son PBMC.

20 Las células iNKT también se conocen como células NKT tipo 1, en contraste con las células NKT tipo 2, que también pueden denominarse células NKT no clásicas o diversas. Excepto cuando el contexto requiera lo contrario, todos los aspectos y realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden considerarse aplicables a las células iNKT. Esto puede estar relacionado con los métodos de la invención, con las poblaciones de células de acuerdo con la invención, o con las composiciones farmacéuticas o los métodos de tratamiento de la invención.

25 Las células adecuadas pueden caracterizarse con referencia a los marcadores celulares que expresan. Ciertos marcadores se utilizan para caracterizar las poblaciones de células transducidas del segundo aspecto de la invención. Sin embargo, las células pueden definirse de manera útil con referencia a la expresión, o ausencia de expresión, de marcadores adicionales. Simplemente a modo de ejemplo, una célula para usar en un método de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en: una célula CD3+/TCRValpha24+/TCRVbeta11+; una célula CD3+ anti-mAb6B11+; y una célula CD3+/CD1d-/tetramero/alphaGalCer+. Los detalles de estos diversos marcadores se discuten en otra parte de la memoria descriptiva. Excepto donde se indique lo contrario, los métodos de la invención pueden practicarse con respecto a células que expresan cualquiera de estos conjuntos de marcadores enumerados, y cualquiera de dichas células representa poblaciones iniciales adecuadas de las que pueden derivarse poblaciones celulares de la invención.

35 Las células que se van a utilizar en los métodos del primer aspecto de la invención también se pueden caracterizar de forma útil con referencia a su origen.

Convenientemente, las células son células de mamífero y, en particular, pueden ser células humanas. Las células pueden ser células primarias, tomadas directamente de su fuente.

40 Las células pueden proporcionarse en forma de una muestra de sangre, tal como una muestra de sangre periférica. Alternativamente, las células pueden proporcionarse en forma de una muestra de aféresis de sangre, tal como una muestra de linfáferesis o leucoféresis.

45 Las células pueden ser frescas o pueden haber sido previamente congeladas. Que las poblaciones de células previamente congeladas puedan transducirse y expandirse con éxito es un hallazgo sorprendente, ya que no se han informado previamente protocolos para la transducción y expansión celular iNKT congeladas. El hecho de que se puedan usar células de fuentes congeladas en los métodos del primer aspecto de la invención es muy beneficioso, ya que facilita el uso de una amplia gama de materiales de partida, incluyendo células de bancos de células preexistentes.

50 Las células pueden ser de un sujeto donante, por ejemplo, un donante sano. Para los fines de la presente divulgación, esto puede tomarse como un sujeto que no padece la enfermedad que se va a tratar con las células de la invención. Dado que las células iNKT están restringidas por CD1d, una molécula similar a MHC I no polimórfica, y no causan aGVHD, representan una forma particularmente adecuada de células que pueden tomarse de donantes alogénicos y transducirse (por ejemplo, con CAR o CAAR) y expandirse. por los métodos de la invención para producir poblaciones de células terapéuticamente útiles.

El uso de células previamente congeladas también permite que las células de un sujeto que posteriormente requerirá inmunoterapia, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, se almacenen mucho antes de su eventual uso. La recogida y almacenamiento de dichas células puede tener lugar en un momento en el que no se ha identificado la necesidad

de una terapia posterior, por ejemplo, en un momento en que el sujeto está sano, antes de desarrollar la enfermedad que posteriormente requerirá tratamiento.

Quizás incluso más sorprendentemente, los inventores también han encontrado que las células adecuadas pueden ser de un sujeto que requiere prevención y/o tratamiento de un trastorno, por ejemplo, mediante inmunoterapia, en particular, inmunoterapia autóloga. Por ejemplo, las células adecuadas para uso en inmunoterapia autóloga se pueden obtener de un sujeto que padece cáncer, tal como un linfoma activo. Los inventores han demostrado con éxito que dichas células pueden transducirse y expandirse mediante los métodos del primer aspecto de la invención, o generar poblaciones de células del segundo aspecto de la invención.

Este es un hallazgo muy inesperado. No se han informado protocolos publicados anteriormente para la transducción y expansión celular iNKT que utilicen células de pacientes con cáncer (tal como pacientes con linfoma) como material de partida. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente las ventajas que ofrece la capacidad de utilizar células autólogas como punto de partida para la transducción y expansión celular que se van a utilizar en inmunoterapia para cánceres tales como linfoma.

Sin querer vincularse a ninguna hipótesis, los inventores creen que estas ventajas (la capacidad de utilizar células que se han congelado previamente o que se toman de sujetos no sanos) están asociadas con la capacidad de los métodos de la invención para permitir que las células transducción y expansión sin inducir un aumento sustancial en el agotamiento celular. Como se analiza más adelante, las poblaciones de células de la invención exhiben niveles muy bajos de expresión de marcadores de agotamiento, tal como PD1. Esta falta de marcadores de agotamiento es indicativa de la capacidad conservada de las poblaciones de células de la invención, tal como las producidas por los métodos de la invención, para proliferar y permanecer reactivas.

Los métodos de la invención se pueden practicar con éxito en un número relativamente pequeño de células. Simplemente a modo de ejemplo, los métodos de la invención pueden llevarse a cabo en hasta 5,000 células, hasta 10,000 células, hasta 15,000 células, hasta 20,000 células, hasta 25,000 células, hasta 30,000 células, hasta 35,000 células, hasta 40,000 células, hasta 45,000 células o hasta 50,000 células. Alternativamente, los métodos de la invención se pueden llevar a cabo en al menos 5,000 células, al menos 10,000 células, al menos 15,000 células, al menos 20,000 células, al menos 25,000 células, al menos 30,000 células, al menos 35,000 células, al menos 40,000 células, al menos 45,000 células, o al menos 50,000 células. Los métodos de la invención pueden llevarse a cabo en al menos 100,000 células, al menos 200,000 células, al menos 300,000 células, al menos 400,000 células, al menos 500,000 células, o al menos 1,000,000 células, o más.

Selección de célula y un paso de selección de célula

Los métodos del primer aspecto de la invención utilizan un paso de selección antes del paso de activación previa a la transducción. El paso de selección de células permite la selección de células sobre las que se realizarán los métodos de la invención.

El paso de selección de células puede permitir la selección y el aislamiento de poblaciones específicas de células sobre las que se van a practicar los métodos del primer aspecto de la invención. Convenientemente, el paso de selección de células puede permitir el aislamiento de células iNKT.

Una vez que se ha elegido el tipo de célula que se desea seleccionar, el experto en la técnica podrá determinar fácilmente los protocolos y procedimientos adecuados para su uso en un paso de selección de células apropiada. Simplemente a modo de ejemplo, estos pueden emplear un anticuerpo, u otra pareja de unión, que se une a un marcador de superficie celular característico del tipo celular de interés.

Los pasos de selección de células adecuados para su uso en los métodos de la invención pueden utilizar un enfoque de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) o clasificación basada en escaneo de células activadas por fluorescencia (FACS). Alternativamente, un paso de selección de células adecuado puede emplear gradientes de densidad, o similares, para permitir la selección de células deseadas, como se considera en los pasos de enriquecimiento de linfocitos descritos en otra parte de la memoria descriptiva.

Convenientemente, el paso de selección de células puede producir una población de células que comprende al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, o al menos 80 % del tipo de célula seleccionado. Convenientemente, el paso de selección de células puede producir una población de células que comprenda al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 % o al menos 90 % del tipo de célula seleccionado. Convenientemente, el paso de selección de células puede producir una población de células que comprenda al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % del tipo de célula seleccionado. De hecho, el paso de selección de células puede producir una población de células que consiste esencialmente en 100 % del tipo de célula seleccionado.

El paso de selección de células se puede realizar en células que están disponibles en proporciones bajas en la población de células. Estas células, tal como las células iNKT, pueden clasificarse como células raras. El paso de selección de células puede resultar en el aislamiento de poblaciones específicas de células raras.

Los pasos de selección de células adecuados para la selección de células iNKT se describen con más detalle en otra parte de la presente memoria descriptiva.

Activación previa a la transducción

5 Los métodos del primer aspecto de la invención utilizan un paso de activación antes del paso de transducción de células seleccionadas. Este paso de "activación previa a la transducción" permite una transducción viral eficaz de las células antes de su expansión. Los inventores han identificado condiciones particularmente ventajosas para usar en tales pasos de activación previa a la transducción, que conducen a una serie de ventajas notables y sorprendentes.

10 Adecuadamente, el paso de activación previa a la transducción se puede practicar en células a una concentración de células tan baja como 1,000,000, o menos, de células por mililitro. Adecuadamente, el paso de activación previa a la transducción se puede practicar en células a una concentración de células tan baja como 500,000, o menos, células por mililitro. Adecuadamente, el paso de activación previa a la transducción se puede practicar en células a una concentración de células tan baja como 100,000, o menos, células por mililitro. Adecuadamente, la paso de activación previa a la transducción se puede practicar en células a una concentración de células tan baja como 50,000, o menos, células por mililitro. Adecuadamente, la paso de activación previa a la transducción se puede practicar en células a una concentración de células tan baja como 10,000, o menos, células por mililitro. Adecuadamente, la paso de activación previa a la transducción se puede practicar en células a una concentración de células tan baja como 5,000, o menos, células por mililitro. Convenientemente, la transducción previa se puede practicar en células a una concentración de alrededor de 100,000 células por mililitro.

20 Adecuadamente, el paso de activación previa a la transducción puede comprender la activación por incubación de las células que van a transducirse con anti-CD3 y anti-CD28. El anti-CD3 y el anti-CD28 pueden proporcionarse adecuadamente en forma de perlas recubiertas con una mezcla de estos reactivos. Las perlas anti-CD3 y anti-CD28 pueden proporcionarse adecuadamente en una proporción de 1:1 a las células seleccionadas, como se describe en la sección de Ejemplos.

25 Adecuadamente, dicho paso de activación previa a la transducción puede comprender la incubación de las células con IL-15. Adecuadamente, se proporciona IL-15 a una concentración de aproximadamente 30 UI/ml dentro del medio en el que se efectúa la activación previa a la transducción. Por ejemplo, se puede proporcionar IL-15 a una concentración de entre aproximadamente 25 UI/ml y aproximadamente 35 UI/ml. Adecuadamente, se puede usar IL-15 en combinación con anti-CD3 y anti-CD28, como se describe anteriormente.

30 El paso de activación previa a la transducción puede llevarse a cabo en presencia de PBMC irradiadas. Adecuadamente, las PBMC irradiadas son PBMC autólogas. Para evitar dudas, "autólogo" debe definirse con referencia a las células que se activan mediante un método de la invención. Adecuadamente, las PBMC se proporcionan en una proporción de 1:1 con respecto a las células con respecto a las cuales se realiza la activación previa a la transducción.

35 Las PBMC irradiadas sirven como células presentadoras de antígenos, desempeñando así un papel en el logro de la activación previa a la transducción requerida, y también sirven para nutrir las células que se van a transducir y expandir. Estas propiedades pueden tenerse en cuenta al considerar la selección de cualquiera de las PBMC irradiadas adecuadas para su uso en los métodos de la invención. Estas propiedades también pueden tenerse en cuenta cuando se considera la selección de células adecuadas para usar como sustituto de tales PBMC irradiadas, eligiéndose tales células sustitutas o mezclas de células para proporcionar la misma nutrición y presentación de antígeno.

40 Adecuadamente, la presencia de PBMC irradiadas se puede usar en combinación con uno o ambos de:

- incubación con IL-15, y
- incubación con anti-CD3 y anti-CD28.

45 Por lo tanto, un paso de activación previa a la transducción adecuado para usar en un método de la invención puede comprender incubar las células que se van a transducir con cada uno de los siguientes: PBMC irradiadas (tales como PBMC autólogas irradiadas), anti-CD3 y anti-CD28 (tal como como en forma de perlas recubiertas con una mezcla de estos reactivos), e IL-15.

50 Adecuadamente, la paso de activación previa a la transducción se lleva a cabo en ausencia del activador de células iNKT conocido α -galactosilceramida. El hallazgo de que este agente puede excluirse beneficiosamente de los pasos de activación previa a la transducción en los métodos de la invención es sorprendente, ya que la técnica anterior ha sugerido que es muy útil en la transducción y expansión de poblaciones de células iNKT. En cambio, los inventores han descubierto que es preferible el uso de anti-CD3 y anti-CD28, incluso en el caso de métodos practicados en células iNKT. Inesperadamente, se descubrió experimentalmente que los métodos en los que se usa α -galactosilceramida en la activación previa a la transducción en lugar de anti-CD3 y anti-CD28 logran una menor eficiencia de transducción. Quizás más sorprendentemente, los métodos en los que la activación previa a la transducción se lleva a cabo mediante la incubación con anti-CD3 y anti-CD28 combinados con el tratamiento con α -galactosilceramida dan como resultado una mayor muerte celular que aquellos que usan anti-CD3 y anti-CD28, pero no α -Galactosilceramida.

Si bien el uso de anti-CD3 y anti-CD28 en la activación celular T es bien conocido, la combinación de estos agentes con el tratamiento que usa IL-15 en este procedimiento no es convencional.

El paso de activación previa a la transducción es una de las características de los métodos del primer aspecto de la invención que aumenta la eficacia de la transducción que se puede lograr usando estos métodos, en comparación con los de la técnica anterior.

Momento del paso de activación previa a la transducción

Como se establece en el primer aspecto de la invención, el paso de activación previa a la transducción tiene lugar antes del paso de transducción.

Convenientemente, el paso de activación previa a la transducción se practica entre 12 y 24 horas antes del paso de transducción.

En el caso de los métodos de la invención realizados en células recién obtenidas, el paso de activación previa a la transducción puede practicarse adecuadamente hasta 24 después de la recogida de las células que se van a transducir. En el caso de métodos de la invención realizados sobre células previamente congeladas, el paso de activación previa a la transducción puede practicarse hasta 24 horas después del descongelamiento de las células que se van a transducir.

Transducción celular y un paso de transducción celular.

A los efectos de la presente invención, se entiende por "transducción celular" la transferencia de material genético desde un organismo a una célula de otro organismo por medio de un vector genético. En particular, se puede considerar que la transducción celular abarca la transferencia de material genético a una célula, o población de células, que da como resultado la expresión de un CAR.

Otros ejemplos de material genético que puede transferirse a una célula por transducción (ya sea en lugar de, o además del material que codifica un CAR), incluyen aquellos seleccionados independientemente de los grupos que consisten en: un gen suicida; un gen que codifica una proteína con una función inmunitaria relevante; un circuito transcripcional sintético; y una herramienta de edición de genes. Los ejemplos de proteínas con una función inmunitaria relevante pueden incluir citoquinas, tales como IL-12 o IL18, o adaptadores inmunitarios, tales como DAP12.

La transducción se logra a través de un paso de transducción. Este paso de transducción se realiza antes de la expansión de la población de células en los métodos de la invención. Realizar la transducción antes de la expansión de las células de la invención significa que se transfectan menos células que en el caso de los métodos de la técnica anterior conocidos por los expertos en la técnica. Se apreciará que estos métodos que requieren la transfección de menos células proporcionarán el beneficio de costes reducidos en comparación con los métodos de la técnica anterior.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que realizar el paso de transducción antes de la expansión celular proporciona la ventaja inesperada de una eficiencia de transducción constantemente incrementada usando cantidades reducidas de reactivos relevantes. De hecho, los métodos de la invención permiten alcanzar niveles de eficiencia en la transducción celular que son mucho más altos cuando se comparan experimentalmente con los informados previamente para su uso con respecto a células tales como iNKT.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que la eficacia de la transducción celular (es decir, la proporción de células que expresan una proteína codificada por un ácido nucleico transducido) aumenta en los métodos de la invención. Convenientemente, los métodos de la invención proporcionan una población de células de la invención que tiene una eficiencia de transducción de al menos 60%.

De hecho, una población de células producida por un método de la invención, o de acuerdo con el segundo o tercer aspecto de la invención, o para incorporarse en una composición farmacéutica de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, puede comprender al menos 61 %, al menos 62 %, al menos 63 %, al menos 64 % o al menos 65 % de células transducidas. Dicha población puede comprender al menos 66 %, al menos 67 %, al menos 68 %, al menos 69 %, al menos 70 %, al menos 71 %, al menos 72 %, al menos 73 %, al menos 74 %, al menos al menos 75 %, al menos 76 %, al menos 77 %, al menos 78 %, al menos 79 % o al menos 80 % de células transducidas. Adecuadamente, dicha población puede comprender al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o más, de células transducidas.

Se apreciará que un método que aumenta la eficiencia de la transducción sirve para proporcionar costes de producción reducidos, ya que se necesitan menos reactivos de transducción para lograr un nivel dado de rendimiento.

En una realización adecuada, el paso de transducción se realiza hasta 24 horas después de la recolección de una población fresca de células que se van a transducir. Por ejemplo, en una realización adecuada, el paso de transducción se realiza 24 horas después de la recogida de tal población de células.

Alternativamente, en el caso de que los métodos de la invención se pongan en práctica con respecto a células previamente congeladas, el paso de transducción se puede realizar inmediatamente después de la descongelación de las células congeladas que se van a transducir.

- 5 En una realización adecuada, el paso de transducción se realiza inmediatamente después de completar el paso de activación previa a la transducción.

El paso de transducción del método de la invención se lleva a cabo en presencia de IL-15.

Las técnicas preferidas para la transducción lentiviral de las células de la invención, la determinación de la eficacia de la transducción y la clasificación de las células transducidas se describen con más detalle en los Ejemplos.

Expansión celular

- 10 Los métodos del primer aspecto de la invención comprenden una fase de expansión celular. Para los fines de la presente invención, se considera que "expansión celular" abarca cualquier proceso mediante el cual se aumenta el número de células en una población de células. En el caso de células seleccionadas por una característica deseable, la expansión celular debe permitir que la característica deseada sea retenida por al menos un subconjunto de la población de células expandida.

- 15 La fase de expansión celular se practica después del paso de transducción. Convenientemente, la fase de expansión celular se puede realizar inmediatamente después del paso de transducción.

- En una realización adecuada, un método de la invención puede emplear una fase de expansión celular única. Alternativamente, un método adecuado de la invención puede emplear dos o más fases de expansión celular. En tal realización, las fases de expansión celular pueden estar separadas por uno o más pasos de activación celular transducida. Por ejemplo, un paso de activación celular transducida puede efectuarse en los días 5-7, con células transducidas reestimuladas por la presencia de IL-15, células presentadoras de antígenos y un antígeno adecuado, seguido de una segunda fase de expansión celular. Detalles adicionales de los pasos de activación celular transducidas que pueden usarse en los métodos de la invención se describen en otra parte de la memoria descriptiva.

- 25 En una realización adecuada, un método de la invención emplea dos fases de expansión. La primera fase de expansión celular puede durar hasta el día 5-7 después del inicio de la activación previa a la transducción. La segunda fase de expansión celular puede tener lugar durante un período de aproximadamente dos semanas.

Si la proliferación celular se ralentiza o cesa, o si después del final de dicha segunda fase de expansión celular aún no se ha obtenido el número deseado de células, se puede aplicar un paso adicional de activación celular transducidas. Esto puede ser seguido por una tercera fase de expansión celular.

- 30 Adecuadamente, una fase de expansión celular para uso en los métodos de la invención puede conducir a la generación de una población de al menos 10,000 células. Adecuadamente, una fase de expansión celular para usar en los métodos de la invención puede conducir a la generación de una población de al menos 100,000 células, al menos 250,000 células, al menos 500,000 células, al menos 750,000 células, al menos 1,000,000 células, al menos 10,000,000 células, al menos 50,000,000 células, al menos 100,000,000 células, al menos 250,000 000 células, al menos 500,000,000 células o 1,000,000,000 células o más.

Características opcionales de los métodos de la invención.

Como se ha expuesto anteriormente, los métodos de la invención pueden comprender varios pasos o fases opcionales, además de los actualmente especificados por el primer aspecto de la invención. Estos pasos o fases adicionales se analizan con más detalle a continuación.

- 40 *Uso de grado clínico*

Los métodos de la invención son adecuados para uso de grado clínico. Dichos usos se emplearán cuando las células que se van a transducir y expandir se vayan a usar con fines terapéuticos, por ejemplo, en composiciones farmacéuticas, usos médicos o métodos de tratamiento de la invención.

- 45 En tales casos, la selección de células, tal como la selección de células iNKT, se puede realizar utilizando materiales adecuados, tales como la columna CliniMACS de grado clínico.

Se apreciará que muchas de las realizaciones expuestas en esta divulgación se pueden utilizar en el escalado clínico de los métodos de la invención.

Un paso de enriquecimiento de linfocitos

- 50 Un método de la invención puede comprender un paso adecuado de enriquecimiento de linfocitos. Dicho paso de enriquecimiento de linfocitos se puede realizar antes del paso de selección de células (tal como la selección de células iNKT) mencionado a continuación.

Simplemente a modo de ejemplo, un paso de enriquecimiento de linfocitos adecuado para usar en un método de la invención puede hacer uso de un medio de gradiente disponible comercialmente tal como Ficoll-Hypaque o Lymphoprep. Los detalles técnicos de un protocolo ejemplar adecuado para usar en un método de la invención, por ejemplo, en un método para usar en la transducción y expansión de poblaciones de células iNKT, se exponen en los

Un paso de selección de células iNKT

Como se analiza en otra parte de la memoria descriptiva, el paso de selección de células de un método del primer aspecto de la invención puede comprender opcionalmente un paso de selección de células iNKT. Si está presente, este paso debe tener lugar antes del paso de activación previa a la transducción.

Un paso de selección de células iNKT adecuado puede hacer uso de una técnica para la selección de células que emplea un anticuerpo adecuado, o un tetrámero basado en CD1d, o similares. Simplemente a modo de ejemplo, dicha técnica basada en anticuerpos puede emplear un anticuerpo capaz de unirse específicamente al iTCR. Por ejemplo, una técnica adecuada puede emplear el anticuerpo monoclonal 6B11, o un fragmento o derivado del mismo. Los reactivos de selección celular que incorporan 6B11 pueden adquirirse de Miltenyi Biotec o BD Bioscience. Alternativamente, dicha técnica adecuada puede emplear un anticuerpo equivalente, o un fragmento o derivado del mismo.

Los inventores han descubierto que un paso de selección de células iNKT ofrece una serie de ventajas en realizaciones de la invención practicadas con respecto a las células iNKT. En dichas realizaciones, el uso de un paso de selección de células iNKT puede usarse para producir una población de células que comprenda al menos 80 % de células iNKT. El uso de poblaciones que comprenden esta alta proporción de células iNKT es beneficioso, ya que reduce la probabilidad de que otros tipos de células presentes en una población de PBMC "sobrecrezcan" aquellas células iNKT que están presentes.

Adecuadamente, el paso de selección de células iNKT puede producir una población de células que comprenda al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 % o al menos 90 % de células iNKT. Adecuadamente, el paso de selección de células iNKT puede producir una población de células que comprende al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos al menos 98%, o al menos 99% de células iNKT. De hecho, el paso de selección de células iNKT puede producir una población de células que consiste esencialmente en 100% de células iNKT.

Los pasos de selección de células iNKT adecuados para su uso en los métodos de la invención pueden utilizar un enfoque de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) o una clasificación basada en escaneo de células activadas por fluorescencia (FACS). Adecuadamente, el enfoque de clasificación de células puede usar el anticuerpo monoclonal 6B11 para unirse a las células iNKT que se van a seleccionar. Los detalles de un protocolo de selección de iNKT adecuado que se puede usar de esta manera se establecen en la sección de Ejemplos a continuación.

Las realizaciones de la invención que utilizan un paso de selección de células iNKT son beneficiosas para garantizar que la proliferación celular provocada por el paso de activación previa a la transducción no hace que las células que no son iNKT superen a las células iNKT antes de la transducción celular.

Un paso de selección de células transducidas

En una realización adecuada, un método de la invención puede comprender un paso de selección de células transducidas. Esto puede ser, además del paso de selección de células que puede practicarse antes del paso de activación previa a la transducción. Se apreciará que este paso de selección celular inicial se realiza con respecto a las células no transducidas, en contraste con el paso de selección de células transducidas (que se realiza con respecto a las células transducidas, tal como las células iNKT que expresan los CAR).

Puede emplearse un paso de selección de células transducidas en métodos de la invención donde se desee obtener una población de células que comprenda una proporción particularmente alta de células transducidas. Por ejemplo, en determinadas aplicaciones de investigación, pueden ser necesarias poblaciones que contengan 80 % o más de células transducidas. En estas circunstancias, se pueden utilizar métodos que comprenden un paso de selección de células transducidas.

En otros contextos, tales como la producción de células transducidas para uso clínico, pueden ser aceptables poblaciones que comprenden proporciones más bajas de células transducidas. En estos contextos, puede que no sea necesario utilizar un paso de activación celular transducidas. Dado que los métodos de la invención que carecen de un paso de selección de células transducidas son consistentemente capaces de proporcionar poblaciones de células que comprenden al menos 60 % de células transducidas, se apreciará que los pasos de selección de células transducidas siguen siendo opcionales en los métodos de la invención diseñados para producir células transducidas con para usos terapéuticos.

Los métodos de la invención pueden comprender uno o pasos de selección de células transducidas.

Los detalles de las técnicas adecuadas para su uso en un paso de selección de células transducidas pueden determinarse con base en la naturaleza de la transducción que se ha realizado. Se apreciará que las técnicas adecuadas pueden hacer uso de un compañero de unión que indica la presencia del producto de la transducción (tal como un CAR) en aquellas células que se han transducido con éxito, y emplear esto como base para la selección.

Por ejemplo, una pareja de unión adecuada puede ser un anticuerpo, o un fragmento o variante del mismo, capaz de unirse a un CAR (u otro producto de transducción) en una célula transducida.

Una técnica adecuada puede ser una técnica de escaneo de células activadas por fluorescencia (FACS) o MACS. Los detalles de un paso de selección de células transducidas de ejemplo adecuado para su uso en la selección de células iNKT transducidas para expresar un CAR se exponen en los Ejemplos.

Normalmente, un paso de selección de células transducidas de acuerdo con las realizaciones establecidas anteriormente es capaz de producir una población de células que comprende al menos 90 % de células transducidas, incluso cuando tales células representan tan solo 10 % de la población preseleccionada.

Un paso de activación celular transducido

Como se mencionó anteriormente, en una realización adecuada, un método de la invención puede emplear un paso de activación celular transducidas. El paso de activación celular transducidas puede seguir a la fase de expansión celular y puede seguir a un paso de selección de células transducidas opcional.

El paso de activación celular transducidas puede comprender la exposición de las células a un agonista adecuado. Por ejemplo, un paso adecuado de activación celular transducidas adecuado para usar en los métodos de la invención puede comprender la administración de señales de moléculas solubles y celulares apropiadas que asegurarán la supervivencia, proliferación y persistencia de las células transducidas. Las señales apropiadas pueden seleccionarse con referencia al tipo de célula elegido que va a activarse. Simplemente a modo de ejemplo, tales señales pueden incluir el uso de bisfosfonatos para activar las células T_{gd} transducidas.

Un paso de activación celular iNKT transducidas

En el caso de los métodos de la invención practicados en células iNKT, un paso adecuado de activación celular iNKT transducidas puede emplear cualquier agonista de células iNKT capaz de activar células iNKT.

El experto en la técnica conocerá los agonistas adecuados que pueden emplearse de esta manera. Simplemente a modo de ejemplo, un agonista de células iNKT adecuado para usar en una estimulación de células iNKT en un paso de activación celular iNKT transducidas puede seleccionarse del grupo que consiste en glicolípidos que inducen la polarización TH1 de células iNKT (por ejemplo, α -GalCer; treitolceramida) que son activos en presencia de células presentadoras de antígeno CD1d⁺.

Un paso adecuado de activación celular iNKT transducidas para su uso en los métodos de la invención se puede realizar en presencia de células presentadoras de antígeno irradiadas. Adecuadamente, las células presentadoras de antígenos expresan CD1d y, opcionalmente, una molécula objetivo reconocida por un CAR expresado por las células que se van a estimular.

Un paso adecuado de activación celular iNKT transducidas para usar en los métodos de la invención se puede realizar en presencia de IL-15.

Los detalles de un paso de activación celular iNKT transducidas a modo de ejemplo adecuado para su uso en la selección de células iNKT transducidas para expresar un CAR se exponen en los Ejemplos.

Otra fase de expansión celular

En una realización adecuada, un método de la invención puede comprender una fase de expansión celular adicional, además de la fase de expansión celular especificada en el primer aspecto de la invención. Los métodos de la invención pueden comprender una o más fases de expansión adicionales, de manera que un método comprende un total de dos fases de expansión (es decir, una fase de expansión adicional), tres fases de expansión (es decir, dos fases de expansión adicionales) o más.

La fase de expansión celular adicional puede implicar activación celular y/o estimulación celular. En el caso de métodos en los que las células iNKT deban someterse a una fase de expansión celular adicional, la activación celular puede lograrse mediante el uso de CD3 y CD28. La estimulación celular puede hacer uso de la exposición de iNKT a una combinación de CD1d⁺ células y células presentadoras de antígenos. Las realizaciones en las que se usa la estimulación celular son ventajosas en términos del grado de expansión que se puede lograr y la funcionalidad mejorada de las células expandidas producidas.

Una fase de expansión celular adicional puede hacer uso de la incubación de las células con IL-15.

Puede continuarse una fase adicional de expansión celular durante el tiempo que sea necesario para producir una cantidad deseada de células. Adecuadamente, las células pueden cultivarse durante aproximadamente una semana durante una fase de expansión celular adicional adecuada.

5 Los inventores han encontrado que la agitación de las células durante una fase de expansión celular adicional promueve el crecimiento. Por lo tanto, una fase de expansión celular adicional puede comprender el cultivo de células con agitación. A modo de ilustración, la agitación puede ser una agitación orbital suave. Una frecuencia adecuada de agitación puede estar en la región de 85 ciclos por minuto.

Los detalles de la fase de expansión celular adicional adecuada para su uso en la selección de células iNKT transducidas para expresar un CAR se exponen en los Ejemplos.

10 *Uso de IL-15*

Como se mencionó anteriormente, una serie de pasos de los métodos de la invención, ya sean necesarios u opcionales, pueden practicarse en presencia de IL-15.

15 Simplemente a modo de ejemplo, se puede realizar un paso previo a la transducción en presencia de IL-15. Se puede realizar un paso previo a la transducción en presencia de IL-15 a una concentración de entre 5 UI/ml a 200 UI/ml. Por ejemplo, se puede realizar un paso previo a la transducción en presencia de IL-15 a una concentración de entre 15 UI/ml a 100 UI/ml. Adecuadamente, se puede realizar un paso previo a la transducción en presencia de IL-15 a una concentración de 30 UI/ml.

20 Se requiere la presencia de IL-15 en los pasos de transducción celular para usar en los métodos de la invención. En una realización adecuada, el paso de transducción celular puede tener lugar en presencia de IL-15 a una concentración de entre 30 UI/ml a 10000 UI/ml. Por ejemplo, el paso de transducción celular puede tener lugar en presencia de IL-15 a una concentración de entre 100 UI/ml a 500 UI/ml. Convenientemente, el paso de transducción celular puede tener lugar en presencia de IL-15 a una concentración de 150 UI/ml.

25 Se realiza una fase de expansión celular en presencia de IL-15 en los métodos de la invención. Convenientemente, se realiza una fase de expansión celular en presencia de IL-15 a una concentración de 5 UI/ml a 200 UI/ml. Por ejemplo, se puede realizar una fase de expansión celular en presencia de IL-15 a una concentración de 5 UI/ml a 200 UI/ml. Convenientemente, se puede realizar una fase de expansión celular en presencia de IL-15 a una concentración de 30 UI/ml.

30 Simplemente a modo de ejemplo, se puede realizar un paso de activación celular posterior a la transducción (tal como un paso de activación celular iNKT posterior a la transducción) en presencia de IL-15. Adecuadamente, se puede realizar un paso de activación celular posterior a la transducción en presencia de IL-15 a una concentración de entre 5 a 400 UI/ML. Por ejemplo, se puede realizar un paso de activación celular posterior a la transducción en presencia de IL-15 a una concentración de entre 30 a 100 UI/ML. Convenientemente, se puede realizar un paso de activación celular posterior a la transducción en presencia de IL-15 a una concentración de 60 UI/ml.

35 En el caso de que se deba emplear una fase de expansión celular adicional, esto también puede implicar la incubación de las células transducidas en presencia de IL-15. Adecuadamente, se puede proporcionar IL-15 a las células a una concentración inicial de entre aproximadamente 100 UI/ml y 200 UI/ml. Por ejemplo, una fase adicional de expansión celular puede implicar proporcionar a las células IL-15 a una concentración inicial de 150 UI/ml. Opcionalmente, el medio que contiene IL-15 no se reemplaza durante una fase de expansión celular adicional adecuada.

40 El uso de IL-15, en lugar de la IL-2 más comúnmente utilizada, en los métodos de la invención proporciona una serie de ventajas.

45 Aunque se ha informado que la administración repetida de IL-2 es útil para mantener la viabilidad de las células iNKT transducidas *in vivo*, se reconocerá que el uso de IL-2 en seres humanos está asociado con efectos secundarios potencialmente graves. Estos incluyen, pero no se limitan a: fiebre, escalofríos, dolores articulares y musculares, aumento de peso debido a los líquidos, frecuencia cardíaca rápida, baja producción de orina, presión arterial baja, náuseas, vómitos, diarrea, enrojecimiento de la piel, picazón, sueños vívidos y confusión.

Al emplear IL-15, en lugar de IL-2, los métodos de la invención evitan que las células producidas dependan de la IL-2 y, por lo tanto, evitan la necesidad de una administración de seguimiento de IL-2 cuando las células se han proporcionado a un sujeto terapéuticamente. Por tanto, los métodos de acuerdo con esta realización de la invención pueden evitar muchos de los efectos secundarios indeseables asociados con la administración de IL-2.

50 *Una población de células*

En el presente documento se divulga, pero no forma parte de la invención, una población de células que tienen ciertas características definitorias. Se puede producir adecuadamente una población de células mediante un método del primer aspecto de la invención.

Las características que definen las células de las poblaciones se describen con más detalle en otra parte de esta divulgación, particularmente bajo el título "marcadores celulares".

Como se divulga en el presente documento, pero no forma parte de la invención, las poblaciones de células pueden comprender PBMC transducidas. Tales PBMC transducidas pueden comprender células T transducidas. Las células T transducidas adecuadas pueden incluir una célula iNKT transducida. Las células no transducidas del tipo considerado en este párrafo representan formas adecuadas de poblaciones de partida de las que pueden derivarse las poblaciones celulares de la invención.

Una población de células puede comprender al menos 100 células. Se apreciará que una población de células en el contexto de la invención puede comprender al menos 1,000 células, al menos 10,000 células, al menos 100,000 células, al menos 250,000 células, al menos 500,000 células, al menos 750,000 células, al menos 1,000,000 células, al menos 10,000,000 células, al menos 50,000,000 células, al menos 100,000,000 células, al menos 250,000,000 células, al menos 500,000,000 células, o al menos 1,000,000,000 o más células. De hecho, una población de células de acuerdo con el segundo aspecto de la invención puede comprender al menos 2,000,000,000 células, al menos 5,000,000,000 células o al menos 10,000,000,000 células.

En aras de la brevedad, las células que componen una población de células de acuerdo con la invención pueden denominarse en el presente documento "células de la invención".

Una población de células divulgada en el presente documento, pero que no forma parte de la invención, puede utilizarse adecuadamente para un uso médico. Simplemente a modo de ejemplo, se puede usar una población de células para inmunoterapia, del tipo descrito en otra parte de la presente divulgación. De hecho, excepto cuando el contexto requiera lo contrario, una población de células puede utilizarse adecuadamente para usos médicos, en particular los descritos en relación con los métodos de inmunoterapia.

Una composición farmacéutica proporciona un medio adecuado mediante el cual se puede proporcionar una población de células a un sujeto en el que las células se van a utilizar médicamente.

Moléculas expresadas por células transducidas

Las células transducidas expresan una molécula no nativa codificada por el material con el que se han transducido las células. Adecuadamente, la molécula no nativa puede seleccionarse del grupo que consiste en: un receptor de antígeno quimérico (CAR); y un receptor de autoanticuerpos quimérico (CAAR). Más adelante se consideran detalles adicionales de ejemplos adecuados de tales moléculas.

Receptores de antígenos quiméricos (CAR)

Los métodos de la invención pueden comprender la transducción de células con un ácido nucleico que codifica un CAR. Las células de las poblaciones celulares de la invención se han transducido de manera que expresan los CAR. Convenientemente, las células de la invención son células iNKT que comprenden un CAR.

Los CAR son proteínas quiméricas transmembrana modificadas para asignar especificidad de antígeno a las células que las expresan. Son receptores recombinantes que comprenden un ectodominio, que comprende una fracción de unión al objetivo, un endodominio que comprende una región de señalización intracelular.

Son los ectodominios, y en particular las fracciones de unión al objetivo de estos dominios, los que confieren especificidad antigénica a los CAR y, por tanto, a las células que los expresan. Esta especificidad de antígeno permite que las células que expresan CAR se dirijan a los tipos de células deseados asociados con enfermedades, tales como el cáncer. Los ectodominios adecuados y las fracciones de unión al objetivo que pueden incorporarse en estos se describen con más detalle a continuación.

Ectodominios CAR y fracciones de unión al objetivo

La región de unión al antígeno del CAR es una secuencia que se presenta en la superficie de las células T. Están modificados para tener especificidad de unión al antígeno. Esta especificidad permite que las células T se dirijan a ciertas condiciones o infecciones.

La región de unión a antígeno puede comprender una o más secuencias de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) derivadas de una inmunoglobulina. Alternativamente, la región de unión al antígeno puede ser un ligando natural.

Adecuadamente, los scFv pueden derivar de inmunoglobulinas murinas o humanas. El scFv es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de inmunoglobulinas conectadas por un péptido conector más corto de aproximadamente 10-25 aminoácidos. La región de unión al antígeno puede ser uno o más scFv contra una molécula objetivo. Una molécula objetivo adecuada puede ser un antígeno (o antígenos) de superficie celular expresado en una célula tumoral o una célula que contiene patógenos.

Endodominios CAR y regiones de señalización intracelular

Como se mencionó anteriormente, los endodominios de los CAR, y en particular sus regiones de señalización intracelular confieren actividad biológica a las células que expresan los CAR en respuesta a la unión del ectodominio.

Un endodominio CAR adecuado para usar en los métodos o células de la invención comprende al menos una región de señalización intracelular. La región de señalización intracelular sirve para acoplar la unión de la fracción de unión al objetivo a una molécula objetivo con otras actividades biológicas de la célula que expresa la proteína. En particular, una región de señalización intracelular adecuada puede acoplar la unión de la fracción de unión al objetivo a su molécula objetivo con la activación de la actividad citocida de la célula, la capacidad de secretar citoquinas y/o la capacidad de la célula para proliferar en respuesta a la activación.

Como se establece en los Ejemplos, una región de señalización intracelular adecuada puede activar la actividad citotóxica o citolítica específica en respuesta a la unión de la molécula objetivo a la fracción de unión objetivo. Como alternativa, o adicionalmente, una región de señalización intracelular adecuada puede facilitar la proliferación celular inducida por activación en respuesta a la unión de la molécula objetivo a la fracción de unión objetivo.

En una realización adecuada, la región de señalización intracelular comprende una región seleccionada del grupo que consiste en: una región de señalización 4-1BB; una región de señalización de OX-40; una región de señalización de CD28; una región de señalización de ICOS; una región de señalización de CD3 ζ ; y una región de interacción con DAP12.

Se apreciará que los CAR expresados por células transducidas de acuerdo con la invención pueden comprender una pluralidad de regiones de señalización intracelular. Adecuadamente, la pluralidad puede comprender más de una copia de una región de señalización intracelular individual. Por ejemplo, una proteína de la invención puede comprender múltiples copias de una o más de: una región de señalización 4-1BB; una región de señalización de OX-40; una región de señalización de CD28; una región de señalización de ICOS; una región de señalización de CD3 ζ ; y una región de interacción con DAP12.

Además, o alternativamente, una proteína de la invención puede comprender una combinación de múltiples regiones de señalización intracelular. Por ejemplo, una proteína de acuerdo con la invención puede comprender una combinación de regiones de señalización intracelular seleccionadas del grupo que consiste en: una región de señalización 4-1BB; una región de señalización de OX-40; una región de señalización de CD28; una región de señalización de ICOS; y una región de señalización de CD3 ζ . Simplemente a modo de ejemplo, una proteína de la invención puede comprender tanto una región de señalización de 4-1BB como una región de señalización de CD3 ζ .

Adecuadamente, una región de señalización de 4-1BB puede comprender la secuencia de longitud completa de 4-1BB. Alternativamente, una región de señalización de 4-1BB puede comprender una forma truncada y/o modificada de la secuencia de longitud completa.

Una región de señalización de OX-40 adecuada puede comprender la secuencia completa de OX-40. Alternativamente, una región de señalización de OX-40 puede comprender una forma truncada y/o modificada de la secuencia de longitud completa.

Una región de señalización de CD28 adecuada puede comprender la secuencia completa de CD28. Alternativamente, una región de señalización de CD28 puede comprender una forma truncada y/o modificada de la secuencia de longitud completa.

Una región de señalización de ICOS puede comprender la secuencia completa de ICOS (también conocida como CD278). Alternativamente, una región de señalización de ICOS puede comprender una forma truncada y/o modificada de la secuencia de longitud completa.

Una región de señalización de CD3 ζ adecuada es aquella que es capaz de activar una respuesta funcional dentro de la célula T (por ejemplo, liberación de citoquinas (por ejemplo, interferón-gamma, TNFa y/o IL2), citotoxicidad y/o proliferación).

Adecuadamente, una región de señalización de CD3 ζ puede comprender la secuencia de longitud completa de CD3 ζ . Alternativamente, una región de señalización de CD3 ζ puede comprender una forma truncada y/o modificada de la secuencia de longitud completa.

DAP12 es un modulador inmunitario, y una región de interacción con DAP12 adecuada denominada ITAM es una que es capaz de heterodimerizarse con DAP12 que conduce a la activación celular inmunitarias.

Una región de interacción con DAP12 puede comprender la secuencia completa de un ITAM. Alternativamente, una región de señalización de DAP12 puede comprender una forma truncada y/o modificada de la secuencia de longitud completa.

Otras porciones de CAR

Los CAR que pueden ser expresados por células transducidas de acuerdo con la invención típicamente comprenden además porciones adicionales, incluyendo una o más del grupo que consiste en: una porción espaciadora de Ig humana o CD8; y una porción transmembranosa de CD8 o CD28.

- 5 Si bien las espaciadores CH2CH3 bisagra de Ig pueden emplearse en CAR para ser expresados por células transducidas de acuerdo con la invención, puede preferirse que un CAR adecuado incluya ninguno o solo uno de los dominios espaciadores CH2 y CH3. Los inventores han descubierto que los CAR de los que se omiten porciones de CH2CH3 tienen una persistencia más prolongada en el organismo.

Moléculas objetivo para ser reconocidas por los CAR

Cáncer	Molécula objetivo de células cancerosas para ser reconocida por un CAR
Cánceres de sangre	
Mieloma múltiple	BCMA (también conocido como TNFRSF17), CS1 (también conocido como CRACC, CD319 y SLAMF7)
Linfoma de células B	CD19, CD20, CD22
Linfoma de células T	CD4, TCRVbeta, TCRalpha
Cánceres CD1d+:	
Leucemia linfocítica crónica (LLC)	CD19, CD20, CD22
Linfoma de células del manto	CD19, CD20, CD22
Linfoma no Hodgkin de la zona marginal	CD19, CD20, CD22
Leucemia de células peludas	CD19, CD20, CD22
Mieloma múltiple (en células plasmáticas)	
Leucemia mieloide aguda mielomonocítica	CD33, CD123,
Leucemia linfoblástica aguda asociada al reordenamiento de MLL	CD33, CD123
Cáncer colorrectal	EGFR, antígeno carcinoembrionario
Cáncer de ovarios	FR-a, CA125
Glioblastoma	IL-13Ra2, EphA2, EGFRvIII, ErbB2 (Her2)

- 10 En una realización adecuada, las células de la invención comprenden un CAR y una molécula de señalización que se une a CD1d.

Receptores de autoanticuerpos quiméricos (CAAR)

- 15 Los receptores de autoanticuerpos quiméricos son proteínas no nativas útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades autoinmunes. El ectodominio de un CAAR comprende una secuencia que se une específicamente a autoanticuerpos asociados con una enfermedad autoinmune.

Las porciones intracelulares (endodominio) de los CAAR pueden, en general, comprender aquellas regiones consideradas anteriormente con respecto a los CAR.

Por el contrario, los ectodominios CAAR comprenden un autoantígeno, o una porción del mismo (tal como una porción que contiene un epítipo), reconocido por un autoanticuerpo asociado con una enfermedad autoinmune.

Algunos ejemplos de enfermedades autoinmunes que pueden prevenirse y/o tratarse con células que expresan CAAR y autoantígenos adecuados para incorporar en los ectodominios de tales CAAR incluyen:

Enfermedad autoinmune	Autoantígeno para incorporarse en un CAAR
Síndrome antifosfolípido (APLS)	Beta2-glucoproteína I
Pemphigus vulgaris	desmogleína 3 (Dsg3) o desmogleína 1 (Dsg1)
Miastenia gravis	• receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR) en aproximadamente 90 % de los pacientes con MG
	• quinasa específica del músculo (MuSK) en el resto
Síndrome de Sjogren	Receptor muscarínico de acetilcolina en las glándulas salivales
Artritis reumatoide	• la región Fc de IgG
	• proteínas citrulinadas
	• colágeno tipo II
Cirrosis biliar primaria	PDC-E2
Trombocitopenia inmune	GP1IbIIIA o GPIb-IX-V

5

Una molécula de señalización que se une a CD1d

Las células pueden comprender una molécula de señalización que se une a CD1d. La molécula de señalización que se une a CD1d puede unirse específicamente a CD1d (como se define en otra parte de la memoria descriptiva).

La actividad de señalización de esta molécula se proporciona solo en la unión de CD1d. La actividad de señalización adecuada permite una o más actividades seleccionadas del grupo que consiste en: activación celular, proliferación, supervivencia y secreción de citoquinas y moléculas citolíticas. Simplemente a modo de ejemplo, la actividad de señalización adecuada puede incluir una o más actividades seleccionadas del grupo que consiste en: proliferación celular; supervivencia celular y secreción de citoquinas y moléculas citolíticas. El experto en la técnica reconocerá que el iTCR que se encuentra en las células iNKT representa un ejemplo adecuado de una molécula de señalización que se une a CD1d. El iTCR al unirse a CD1d puede conducir a una mayor proliferación, supervivencia y secreción de citoquinas y moléculas citolíticas. El hecho de que el iTCR se exprese naturalmente por las células iNKT es ventajoso, ya que evita la necesidad de una mayor transducción de estas células.

Dicho esto, las moléculas de señalización de origen no natural que se unen a CD1d también pueden utilizarse en las células o métodos de la invención. Ejemplos de estos incluyen moléculas naturales (tal como el iTCR) cuando son expresadas por células en las que no se encuentran en la naturaleza, y también moléculas de señalización artificial que se unen a CD1d, tales como formas modificadas o variantes del iTCR. En el caso de realizaciones que emplean un iTCR modificado en células iNKT, la activación puede estar mediada por el adaptador endógeno DAP12. La transducción de células para expresar DAP12 (o sus fragmentos) se considera en otra parte de la memoria descriptiva.

Se reconocerá que la expresión de CD1d está asociada con ciertos cánceres y, por lo tanto, la expresión de una molécula de señalización que se une a CD1d puede ser beneficiosa en el contexto del tratamiento de dichos cánceres. CD1d también puede ser expresada por otras células para que sean objetivo terapéuticamente por células transducidas de la invención. Por ejemplo, CD1d puede ser expresada por macrófagos que contienen patógenos que se van a tratar.

En el caso de las células iNKT, la interacción de iTCR con cualquier célula que exprese CD1d proporciona señales de supervivencia de baja afinidad a las células iNKT, lo que contribuye a su persistencia. Las células a las que se introduce artificialmente el iTCR también pueden beneficiarse de esta actividad.

Actividades biológicas de las células de la invención

Las células de la invención exhiben una serie de actividades que son beneficiosas en aplicaciones tales como inmunoterapia para la prevención y/o tratamiento de enfermedades.

5 Estas actividades biológicas pueden considerarse adicionalmente con referencia a las actividades citocidas que representan los medios por los cuales las células de la invención pueden ejercer sus efectos terapéuticos.

10 La actividad biológica de las células de la invención puede determinarse con referencia a células de comparación adecuadas. Los ejemplos de células de comparación adecuadas incluyen células del mismo tipo que las de la invención que no han sido transducidas, o células que han sido transducidas y expandidas por métodos distintos a los de la invención. En el caso de células CD4-iNKT transducidas de la invención, las células de comparación adecuadas pueden comprender células CD4+ iNKT transducidas.

Actividad citocida de las células de la invención

15 Para los fines de la presente invención, la actividad citocida debe considerarse como que abarca cualquier actividad por la cual las células de la invención asesinan a otras células. A modo de ejemplo, la matanza de otras células puede lograrse mediante la acción citotóxica de las células de la invención, o mediante la lisis celular específica mediada por las células de la invención.

Las células de la invención pueden ejercer su actividad citocida con respecto a estructuras objetivo que comprenden moléculas objetivo unidas por las células. Dichos objetivos pueden estar unidos por fracciones de unión a objetivos, tal como los que se encuentran en los endodominios de CAR que pueden expresar las células de la invención.

20 Preferiblemente, las células asesinadas por la actividad citocida de las células de la invención son células asociadas con una enfermedad. Convenientemente, las células asociadas con una enfermedad pueden ser células cancerosas o células infectadas con un patógeno.

Como se establece en los Ejemplos, los inventores han demostrado que las células de la invención exhiben actividad citocida que muestra actividad terapéutica en un modelo animal de linfoma.

25 El experto en la técnica conocerá muchos ensayos adecuados mediante los cuales puede evaluarse la actividad citocida, ya sea actividad citotóxica o lisis celular específica, de una célula de la invención, o una célula de comparación adecuada. Simplemente a modo de ejemplo, el modelo animal de linfoma descrito en los Ejemplos proporciona un ensayo adecuado.

30 El lector experto, al considerar la información expuesta en los Ejemplos, reconocerá que las células de la invención exhiben actividad citocida que las hace muy adecuadas para uso terapéutico en la prevención y/o tratamiento de enfermedades de la manera descrita en esta memoria descriptiva.

Las células, tal como las células iNKT que exhiben una actividad citocida particularmente útil, pueden identificarse por su concentración de estado CD4⁺.

Marcadores celulares

35 Ciertos marcadores celulares son útiles en la caracterización de células adecuadas para su uso en los métodos del primer aspecto de la invención y en la caracterización de poblaciones de células producidas por los métodos del primer aspecto de la invención.

Como se describió más arriba, una célula para usar en un método de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en: una célula CD3+/TCRValpha24+/TCRVbeta11+; una célula CD3+ anti-mAb6B11+; y una célula CD3+/CD1d-/tetramero/alphaGalCer+.

40 El experto en la técnica conocerá muchas técnicas adecuadas mediante las cuales puede investigarse la expresión de marcadores celulares de interés, y mediante las cuales puede lograrse la selección de células que expresan o no expresan tal marcador. Excepto cuando el contexto requiera lo contrario, estas incluyen técnicas de inmunomarcaje, en las que se utiliza un anticuerpo capaz de unirse específicamente al marcador celular en cuestión para asociar un marcador detectable (directa o indirectamente) con el marcador celular deseado.

45 Pueden usarse técnicas de inmunomarcación de este tipo para identificar células que expresan el marcador (o marcadores) especificado, y también para permitir la separación de células con base en los marcadores que expresan.

Las técnicas de inmunomarcaje adecuadas para la separación o clasificación de células incluyen el marcaje con etiquetas fluorescentes (para permitir la clasificación de células activadas por fluorescencia) y el marcaje con marcadores magnéticos (para permitir la clasificación de células activadas magnéticamente).

50 *Marcadores útiles para identificar células adecuadas para su uso en los métodos de la invención*

Células que expresan CD3+TCRValpha24+TCRVbeta11+; o CD3+ anti-mAb6B11+; o CD3+CD1d-tetramer/alphaGalCer+ pueden ser células iNKT. Este repertorio restringido de TCR es diferente a las células T convencionales, que en su mayoría reconocen antígenos presentados por moléculas MHC.

5 La expresión de CD3 (grupo de diferenciación 3) puede determinarse fácilmente usando anticuerpos disponibles comercialmente.

Las células iNKT pueden identificarse mediante la unión al iTCR del anticuerpo comercialmente disponible mAb6B11 en combinación con anti-CD3.

10 CD1d (grupo de diferenciación 1d) es un miembro de la familia de glicoproteínas CD1. Los tetrámeros CD1d cargados con alphaGalCer (disponible en Proimmune) se unen específicamente a iTCR e identifican células iNKT en combinación con anti-CD3.

La expresión de TCRValpha24/TCRVbeta11 (TCR Vα24/Vβ11) combinada con la expresión de CD3 puede usarse en la identificación de células iNKT. En tales células, la cadena TCR Vα24 está acoplada con una cadena Vβ11, las cuales pueden detectarse mediante anticuerpos adecuados.

Expresión de CD4 (y polarización TH1)

15 CD4 (grupo de diferenciación 4) es un marcador de glicoproteína bien conocido. Se expresa en una variedad de tipos de células, incluyendo las células T (tales como las células iNKT), los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas. Los anticuerpos capaces de unirse específicamente a CD4 están ampliamente disponibles comercialmente.

20 En el caso de las células iNKT transducidas, estas poblaciones de células comprenden una mayor proporción de células CD4⁺ que poblaciones de células producidas por métodos conocidos en la técnica.

Las células CD4⁺ se pueden caracterizar por estar polarizadas en TH1. Tienen una actividad citolítica deseable que los hace útiles en aplicaciones tal como la inmunoterapia. Por el contrario, las células CD4⁺ exhiben polarización TH0 o 2 y pueden tener una actividad citolítica reducida y, por lo tanto, un potencial terapéutico reducido.

25 Para los fines de la presente divulgación, las células polarizadas TH1 pueden caracterizarse por expresar niveles más altos de moléculas citolíticas en comparación con el fenotipo polarizado TH2. Adecuadamente, las moléculas citolíticas pueden comprender una, más o todas las de la lista que consiste en: perforina; granzima; e interferón-gamma (IFN-γ). Además, las células CD4⁺ polarizadas Th1 pueden expresar niveles más bajos de IL-4 en comparación con las células CD4⁺ TH2.

Expresión PD1

30 Los inventores han encontrado que las poblaciones de células producidas por los métodos de la invención tienen una expresión sorprendentemente baja del marcador de agotamiento de células T de la superficie celular PD1 (también denominado "muerte celular programada-1"). Como se describe en el presente documento, las poblaciones de células de acuerdo con la presente invención son al menos 80 % de PD1⁺.

35 De hecho, las poblaciones de células de la invención pueden ser al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 87 %, al menos 88 %, o al menos 89% de PD1⁺. Convenientemente, una población de células de la invención puede ser de al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99% PD1⁺. En una realización adecuada, una población de células de la invención puede ser sustancialmente 100% de PD1⁺.

40 De acuerdo con los datos publicados anteriormente, los protocolos de la técnica anterior normalmente dan como resultado más del 40 % de las células iNKT seleccionadas y cultivadas que expresan PD1 (así como los marcadores de agotamiento TIM3 y LAG3) después de que las poblaciones celulares se hayan expandido, pero antes de la transducción celular. Por ejemplo, dichos valores se han observado 12 días después de la expansión celular iNKT no transducidas. Sería de esperar que la transducción de tales células solo sirviera para aumentar la expresión de
45 marcadores de agotamiento.

Los expertos en la técnica saben que PD1 es un marcador de agotamiento de células T comúnmente utilizado. Por lo tanto, se apreciará que la población de células que es al menos 80% PD1⁺ exhibe bajos niveles de agotamiento. De hecho, la población de células descrita en el presente documento puede exhibir un agotamiento significativamente menor que las publicadas previamente en la técnica anterior.

50 Como se muestra en los ejemplos que siguen, los inventores han demostrado que, 23 días después de la transducción de CAR, el nivel de expresión del marcador de agotamiento de células T de superficie PD1 es inferior al 20 % entre las células iNKT que se han transducido para expresar un CAR anti-CD19. Una población de células de la invención puede tener un nivel de expresión de PD1 inferior al 19 %, inferior al 18 %, inferior al 17 %, inferior al 16 %, inferior al 15 %, inferior al 14 %, inferior al 13 %, inferior al 12%, inferior al 11% o inferior al 10%. Adecuadamente, una población

de células de la invención puede tener un nivel de expresión de PD1 inferior al 9 %, inferior al 8 %, inferior al 7 %, inferior al 6 %, inferior al 5 %, inferior al 4 %, inferior al 3%, inferior al 2% o inferior al 1%. Una población de células de la invención puede estar sustancialmente libre de expresión de PD1. El nivel de expresión del marcador de agotamiento de células T de superficie PD1 puede evaluarse entre 15 y 32 días después de la transducción de CAR. Convenientemente, el nivel de expresión de PD1 puede evaluarse entre 21 y 25 días después de la transducción de CAR. El nivel de expresión de PD1 puede evaluarse 23 días después de la transducción.

Es muy sorprendente que las células muestren niveles tan bajos de expresión de marcadores de agotamiento incluso después de que hayan tenido lugar tanto la expansión como la transducción. En general, se esperaría que estos procedimientos, y el mantenimiento de las células en cultivo, aumentaran notablemente el agotamiento celular y, por lo tanto, los niveles de expresión de PD1.

La baja expresión de marcadores de agotamiento observada con respecto a las células indica que estas células conservan una viabilidad y funciones biológicas ventajosas. Como se discutió en otra parte, sin desear limitarse a ninguna hipótesis, los inventores creen que esto contribuye a la capacidad de usar con éxito células de fuentes tales como células congeladas o células de pacientes con cáncer activo, en los métodos de la invención. Dichas fuentes han demostrado ser problemáticas previamente, particularmente como materiales de partida para la preparación de poblaciones de células iNKT transducidas. Esta viabilidad mejorada de las células producidas por los métodos de la invención también puede contribuir a su persistencia y, por lo tanto, a una mayor eficacia terapéutica *in vivo*.

Persistencia *in vivo*

Los resultados logrados en los Ejemplos indican que las células son capaces de una persistencia prolongada y, por lo tanto, de una actividad terapéutica prolongada, *in vivo*. En particular, los resultados obtenidos en el modelo de linfoma animal son indicativos de la persistencia de las células de la invención en un sujeto al que se le han administrado.

Vale la pena señalar que la mala persistencia es un problema reconocido con respecto a las células iNKT transducidas notificadas en la técnica anterior, por lo que el lector experto apreciará estos hallazgos como indicativos de un beneficio sorprendente proporcionado por las células y los métodos de la presente invención.

Usos médicos y métodos de tratamiento.

Las células o composiciones farmacéuticas que las comprenden pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de una serie de enfermedades. Esto puede incluir el uso en el tratamiento inicial de una serie de enfermedades. Dichos usos pueden ser en prevención primaria (por ejemplo, tratamiento de condiciones pre-malignas) o prevención secundaria (por ejemplo, tratamiento de enfermedad residual mínima en cáncer).

Las células pueden proporcionarse en forma de una composición farmacéutica de la invención. Se apreciará que las poblaciones de células de la invención pueden ser útiles en métodos de inmunoterapia celular. Para evitar dudas, todas las aplicaciones terapéuticas y los usos médicos considerados en la presente divulgación deben tomarse como ejemplos de inmunoterapia. Simplemente a modo de ejemplo, la inmunoterapia que utiliza una población de células producida por el método del primer aspecto de la invención, por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica, puede usarse en el tratamiento del cáncer. En tal ejemplo, las células pueden atacar y asesinar células cancerosas, reduciendo así el número total de células cancerosas en un sujeto que recibe tratamiento. Las células adecuadas para su uso en dichos tratamientos pueden transducirse para expresar un CAR. El tratamiento del cáncer se define con más detalle en otra parte de la presente memoria descriptiva.

De manera similar, la inmunoterapia que utiliza una población de células producida por el método del primer aspecto de la invención puede usarse en el tratamiento de infecciones. En tal ejemplo, las células pueden tener como objetivo y asesinar células asociadas con la infección, reduciendo así el número total de dichas células en un sujeto que recibe tratamiento. Las células que van a usarse en la prevención y/o el tratamiento de infecciones pueden transducirse para expresar un CAR. El tratamiento de infecciones se discute con más detalle en otra parte de la presente memoria descriptiva. Se apreciará que, cuando se va a proporcionar a un sujeto una población de células divulgada en el presente documento para provocar la inmunoterapia, la población de células se proporcionará en una cantidad terapéuticamente eficaz. Dicha cantidad terapéuticamente eficaz puede proporcionarse en una única incidencia de administración de las células de la invención, o mediante múltiples incidencias de administración. Las dosis adecuadas de las células de la invención, por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica de la invención, se consideran en otra parte de la memoria descriptiva.

La prevención de una enfermedad puede ser necesaria cuando un sujeto aún no ha desarrollado una enfermedad y/o el sujeto está en remisión después del tratamiento y se ha identificado que está en riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro. Adecuadamente, dicha identificación puede basarse en detalles tales como la historia clínica del sujeto o su familia, los resultados de las pruebas genéticas del sujeto de su familia o el riesgo de exposición a agentes causantes de enfermedades conocidos. En el caso del cáncer, la prevención primaria puede ser deseable en el caso de un sujeto que muestre síntomas o características de una enfermedad premaligna y la prevención secundaria en el caso de que un sujeto ya haya logrado la remisión del cáncer después del tratamiento.

El tratamiento de una enfermedad puede ser necesario una vez que se ha identificado que un sujeto ya ha desarrollado una enfermedad. El estadio de desarrollo de la enfermedad en el momento de la identificación puede ser sintomático o asintomático. Dicha identificación puede basarse en la evaluación clínica del sujeto, los síntomas presentados por el sujeto o el análisis de muestras proporcionadas por el sujeto (tales como biopsias, muestras de sangre o similares, que permitan identificar la presencia de neoplasias malignas, agentes infecciosos, u otros indicadores de patología).

Composiciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica puede comprender una población de células en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se divulgan, pero no forman parte de la invención, composiciones tales como composiciones en forma de dosis unitaria que incluyen el número de células para administración en una dosis dada o fracción de la misma. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas generalmente incluyen uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales. En algunos ejemplos, la composición incluye al menos un agente terapéutico adicional.

El término "composición farmacéutica" o "formulación" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, entre otros, un tampón, un excipiente, un estabilizador o un conservante. Los agentes tamponadores en algunos ejemplos están incluidos en las composiciones. Los agentes tamponadores adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y varios otros ácidos y sales. En algunos ejemplos, se usa una mezcla de dos o más agentes tamponadores. El agente tampón o mezclas de los mismos están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 4% en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Los métodos ejemplares se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21va ed. (mayo 1, 2005).

Las formulaciones pueden incluir soluciones acuosas.

La composición farmacéutica en algunos ejemplos contiene las células en cantidades efectivas para tratar o prevenir la enfermedad o condición, tal como una cantidad terapéuticamente efectiva o profilácticamente efectiva. La eficacia terapéutica o profiláctica en algunos ejemplos se controla mediante la evaluación periódica de los sujetos tratados. La dosificación deseada puede administrarse mediante la administración en bolo único de las células, mediante administraciones en bolo múltiple de las células o mediante la administración por infusión continua de las células.

Las células y las composiciones se pueden administrar usando técnicas, formulaciones y/o dispositivos de administración estándar. La administración de las células puede ser autóloga o alogénica. Por ejemplo, las células o progenitores inmunosensibles pueden obtenerse de un sujeto y administrarse al mismo sujeto o a un sujeto compatible diferente. Las células inmunoresponsivas derivadas de sangre periférica o su progenie (por ejemplo, derivado *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) se pueden administrar mediante inyección localizada, incluyendo la administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene una célula inmunosensible modificada genéticamente), generalmente se formulará en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión).

Las formulaciones incluyen aquellas para administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o en supositorios. En algunos ejemplos, las poblaciones celulares se administran por vía parenteral. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunos ejemplos, las células se administran al sujeto mediante administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

Las composiciones en algunos ejemplos se proporcionan como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas, que en algunos ejemplos pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas normalmente son más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Además, las composiciones líquidas son algo más cómodas de administrar, especialmente mediante inyección. Las composiciones viscosas, por otro lado, se pueden formular dentro del intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar períodos de contacto más prolongados con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender vehículos, que pueden ser un disolvente o un medio dispersante que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando las células en un disolvente, mezcladas con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (por ejemplo, metilcelulosa), agentes tamponadores del pH, aditivos gelificantes o que mejoran la viscosidad, conservantes, agentes saborizantes y/o colorantes, según la vía de administración y la preparación deseada. Los textos estándar pueden consultarse en algunos ejemplos para preparar preparaciones adecuadas.

Pueden añadirse diversos aditivos que mejoran la estabilidad y esterilidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol y ácido sórbico. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las formulaciones que se va a utilizar para administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Una composición farmacéutica puede utilizarse adecuadamente para un uso médico. Simplemente a modo de ejemplo, se puede usar una composición farmacéutica para inmunoterapia, del tipo descrito en otra parte de la presente divulgación.

Cantidad o tamaño de la dosificación

En algunos ejemplos, una primera dosis o dosis posteriores contiene una cantidad de células (por ejemplo, células que expresan CAR-n o CAAR, cantidad de células T o cantidad de células mononucleares de sangre periférica) en el intervalo de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 de tales células por kilogramo de peso corporal del sujeto, y/o un número de tales células que no es más de aproximadamente 10^5 o aproximadamente 10^8 dichas células por kilogramo de peso corporal del sujeto. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la primera dosis o las subsiguientes incluyen menos o no más de o aproximadamente 1×10^5 , en o aproximadamente 2×10^5 , en o aproximadamente 5×10^5 , o en o aproximadamente 1×10^6 de dichas células por kilogramo de peso corporal del sujeto. En algunos ejemplos, la primera dosis incluye aproximadamente 1×10^5 , en o aproximadamente 2×10^5 , en o aproximadamente 5×10^5 , o en o aproximadamente 1×10^6 de tales células por kilogramo de peso corporal del sujeto, o un valor dentro del intervalo entre cualquiera de los dos valores anteriores. En ejemplos particulares, los números y/o concentraciones de células se refieren al número de receptores recombinantes, por ejemplo, células que expresan CAR o CAAR. En otros ejemplos, los números y/o concentraciones de células se refieren al número o concentración de todas las células, células T o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) administradas.

En algunos ejemplos, el número de células administradas en una dosis posterior es menor que el número de células administradas en la primera dosis. Alternativamente, el número de células administradas en una dosis posterior puede ser aproximadamente el mismo que el número administrado en la primera dosis. En otros ejemplos, el número de células administradas en una dosis posterior es mayor que el número de células administradas en la primera dosis.

En algunos ejemplos, se administran múltiples dosis posteriores después de la primera dosis, de modo que se administra una dosis o dosis adicionales después de la administración de la segunda (u otra dosis posterior). En algunos ejemplos, el número de células administradas al sujeto en la dosis o dosis posteriores adicionales (es decir, la tercera, cuarta, quinta, etc.) es igual o similar a la primera dosis, la segunda dosis y/o u otra dosis posterior. En algunos ejemplos, la dosis o dosis adicionales son mayores que las dosis anteriores.

En algunos ejemplos, el tamaño de la primera y/o dosis subsiguiente está determinado por la carga de la enfermedad o condición en el sujeto. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el número de células administradas en la primera dosis se determina basándose en la carga tumoral que está presente en el sujeto inmediatamente antes de la administración de la primera dosis. En algunos ejemplos, el tamaño de la primera y/o dosis subsiguientes está inversamente correlacionado con la carga de la enfermedad. En algunos ejemplos, como en el contexto de una gran carga de enfermedad, al sujeto se le administra un bajo número de células, por ejemplo, menos de aproximadamente 1×10^6 células por kilogramo de peso corporal del sujeto. En otros ejemplos, como en el contexto de una menor carga de enfermedad, al sujeto se le administra una mayor cantidad de células, tal como más de aproximadamente 1×10^6 células por kilogramo de peso corporal del sujeto.

En algunos ejemplos, el número de células administradas en la dosis posterior se determina basándose en la carga tumoral que está presente en el sujeto después de la administración de la primera dosis. En algunos ejemplos, por ejemplo, cuando la primera dosis ha disminuido la carga de la enfermedad o lo ha hecho por debajo de una determinada cantidad o nivel de umbral, por ejemplo, uno por encima del cual existe un mayor riesgo de resultado tóxico, la dosis posterior es grande, por ejemplo, más de 1×10^6 (por ejemplo, células totales, células que expresan CAR, células T o PBMC) por kilogramo de peso corporal y/o es mayor que la primera dosis. En otros ejemplos, el número de células administradas en la dosis posterior es bajo, por ejemplo, menos de aproximadamente 1×10^6 , por ejemplo, igual o menor que la primera dosis, donde la primera dosis ha reducido la carga tumoral en un grado pequeño o donde la primera dosis no ha conducido a una reducción detectable de la carga tumoral.

En algunos ejemplos, la carga de la enfermedad, el tamaño del tumor, el volumen del tumor, la masa del tumor y/o la carga o el volumen del tumor se reducen después de una dosis posterior en al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90 % o más en comparación con esa dosis. inmediatamente antes de la administración de la primera o anterior dosis o de la segunda o posterior dosis.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Los métodos de optimización de un protocolo personalizado para la modificación CAR de células iNKT y células de la invención se investigaron con referencia a CAR ejemplares, como se analiza más adelante.

10 Los inventores investigaron el protocolo optimizado comparando 4 protocolos diferentes para la generación de células CAR iNKT, incluyendo el descrito en la técnica anterior (protocolo 2 en las tablas 1 y 2 y las Figuras 1 y 2). Los Protocolos 3 y 4 representan ejemplos de métodos de la invención. Mientras que el protocolo 3 ofrece ventajas sobre el estado de la técnica, los inventores encontraron que el protocolo optimizado (Protocolo 4) superó al protocolo conocido en el estado de la técnica (protocolo 2) incluso más dramáticamente. El Protocolo 4 dio como resultado un aumento en la eficiencia de transducción (> 60% de transducción) con un CAR ejemplar específico para CD19 (CAR19).

15 Aunque los Protocolos 3 y 4 representan ejemplos de métodos de la invención, se apreciará que dichos métodos pueden no utilizar todas las características expuestas con respecto a estos protocolos. Los métodos de la invención que utilizan algunas de estas características, en lugar de todas, también pueden constituir enfoques novedosos para la transducción y expansión de poblaciones celulares que proporcionan ventajas que no se encuentran en la técnica anterior.

1 Transducción inicial

En la técnica anterior (protocolo 2), el paso de transducción viral se realiza el día 14 después de la selección de células iNKT y expansión *in vitro*.

25 Por el contrario, en los métodos de la invención ejemplificados por el protocolo optimizado (protocolo 4, Tabla 1 y 2 y Figura 1 y 2), la transducción viral se realiza dentro de las primeras 24 a 48 h posteriores al aislamiento de células iNKT. Este enfoque permite la modificación de un pequeño número de células iNKT y, por lo tanto, el uso de cantidades considerablemente menores de virus de transducción. Es probable que esto resulte en una reducción del coste de fabricación de las células CAR-iNKT.

30 Se puede lograr una mayor eficiencia de transducción viral mediante la transducción inicial (media del 75 %, Tabla 2) y, una vez modificadas genéticamente, las células CAR19 iNKT se expanden sin manipulación adicional durante 6 a 8 días. Cabe señalar que la expansión posterior de células CAR-iNKT de alta pureza requiere que la pureza previa a la transducción de las células iNKT sea > 80 %; si no, en presencia de perlas anti-CD3/CD28, la pureza posterior de las células CAR-iNKT cae drásticamente (Figura 4).

35 La Figura 4 muestra gráficos representativos que muestran preparaciones de células iNKT con menos del 80 % de células 6B11+ (*izquierda*) expandido usando ya sea estimulación específica (α GalCer, *arriba*) o inespecífica (perlas aCD3/CD28, *abajo*) siendo esta última parte de la activación previa a la transducción de las células iNKT. Después de dos semanas, todas las células expuestas a α GalCer eran iNKT (*arriba a la derecha*), mientras que las perlas de aCD3/CD28 inducían una expansión preferencial de las células T convencionales (*abajo a la derecha*).

2 Pretransducción de activación celular iNKT

40 En el protocolo óptimo 4, se emplea un curso corto de activación con perlas anti-CD3/CD28 + IL-15 en presencia de PBMC autólogas irradiadas dentro de las primeras 24-48 horas del protocolo. Esta preactivación mejora la eficacia de la transducción, que depende de la pureza de las células iNKT en el momento de la transducción y requiere un enriquecimiento >80 % (Figura 4).

45 En el estado de la técnica, las células iNKT preactivadas y expandidas se purifican y activan más con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) irradiadas autólogas + α GalCer+IL-2 u OKT3+IL-2 dentro de las primeras 24-48 horas.

3 IL-15 frente a IL-2

50 Los métodos de la invención (ejemplificados por el protocolo optimizado 4) usan IL-15 para activación, transducción (una vez) y expansión (dos veces). Los protocolos conocidos en la técnica utilizan IL-2, que se añade cada dos días durante la fase de expansión preliminar durante 10 días.

4 Material de partida y condiciones de cultivo

Los métodos de la invención (ejemplificados por el protocolo optimizado) son adecuados para células congeladas o células obtenidas de pacientes con cáncer. Sin embargo, los protocolos descritos en la técnica anterior se han limitado al uso específico de células frescas para la transducción y expansión celular iNKT.

Las Figuras 5 y 6 muestran la expansión y transducción exitosas de células iNKT logradas a partir de material de partida fresco o congelado. La Figura 5A muestra un ejemplo representativo de 3^{ra} generación de transducción de CAR19 de células iNKT seleccionadas de células mononucleares de sangre periférica frescas de un paciente con linfoma activo. La selección, la transducción de CAR y la expansión según el protocolo optimizado (protocolo 4) dieron como resultado >90 % de células iNKT transducidas con CAR. En el panel inferior, las células CD19+ representan células de linfoma circulantes. En los diagramas de puntos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), las células iNKT son TCRVa24+Vb11+, las células T son TCRVa24-, mientras que las células transducidas con CAR se identifican mediante tinción con anticuerpo anti-F(ab)2.

La Figura 5B muestra un ejemplo representativo de la transducción CAR de células iNKT seleccionadas de linfátesis de sangre periférica congelada de un individuo sano. Se muestra la misma transducción de CAR derivada del donante para ambas CAR19 de 2^{da} y 3^{ra} generación. En los gráficos de puntos FACS, las células iNKT son TCRVa24+Vb11+, las células T son TCRVa24-, mientras que las células transducidas con CAR se identifican como aquellas que expresan el marcador de superficie quimérico RQR8 codificado por lentivirus.

Los donantes pueden ser personas sanas o pacientes con linfoma u otros tipos de cáncer. Esto puede representar un marcador indirecto de mayor viabilidad de los métodos de la invención (ejemplificado por el protocolo optimizado 4) ya que, hasta donde sabemos, no se ha informado sobre la expansión y modificación génica de células iNKT de pacientes con linfoma.

En el protocolo optimizado actual (protocolo 4), las células iNKT diseñadas con CAR estaban bajo constante agitación durante la fase de expansión. La Figura 6A muestra el resumen de expansión de 3 experimentos independientes de 3 donantes diferentes. La Figura 6B muestra un ejemplo representativo de expansión de escala clínica de células CAR19 T e iNKT de 2^{da} y 3^{ra} generación.

En el estado de la técnica, las células iNKT no modificadas y modificadas con CAR se expandían sin agitación constante.

5 Preservación de la fracción celular iNKT más polarizada TH1

Los métodos de la invención (ejemplificados por el protocolo optimizado 4) aseguran la conservación de la fracción CD4- de las células CAR iNKT (Figura 5). Esto es importante porque las células CD4-iNKT están asociadas con una mayor secreción de IFN γ acorde con una menor secreción de IL-4 (polarización similar a TH1) (Figura 7).

En el protocolo de la técnica anterior, la atención se centra en la expansión preferencial de las células CD62L+. Sin embargo, de acuerdo con los datos representativos que se muestran en la publicación y la patente, el protocolo de expansión parece favorecer la expansión de CD4+ y la pérdida de células CD4-iNKT y, de acuerdo con esto, las células CD62L+ exhibieron una polarización similar a TH0. De acuerdo con esto, se informó anteriormente que al menos el doble de células CD4+ que CD4-iNKT expresan CD62L47.

6 Las células CAR19 NKT tienen doble reactividad contra el antígeno CD1d y CAR en la misma célula objetivo

Los inventores han demostrado que las células CAR iNKT generadas según los métodos de la invención (ejemplificadas por 4 optimizado) ejercen una reactividad citolítica cooperativa contra CD1d y el objetivo CAR (por ejemplo, CD19) coexpresado en las mismas células objetivo (Figura 8).

La Figura 8 (izquierda) muestra que las células K562 parentales no expresan CD1d o CD19 según lo evaluado por citometría de flujo. La transducción del ADNc del gen correspondiente generó líneas celulares que expresaban niveles comparables de CD1d y CD19 individualmente o en combinación. El panel derecho muestra la actividad citotóxica cooperativa de células CAR19 iNKT de 2^{da} generación contra los objetivos que se muestran a la izquierda.

De acuerdo con los datos publicados y de patentes, no hay pruebas directas de que las células CAR iNKT derivadas del protocolo de la técnica anterior ejerzan una reactividad dual contra las mismas células que expresan CD1d y el antígeno CAR objetivo por separado o en combinación.

7 marcadores de agotamiento

Los inventores han demostrado que los niveles de expresión del marcador de agotamiento de células T de superficie PD1 son <20% de las células CAR19-iNKT 23 días después de la transducción de CAR (Figura 9). Esto es inferior a los datos publicados y de patentes de la técnica anterior. El protocolo de la técnica anterior da como resultado >40 % de células CD62L+ iNKT que expresan los marcadores de agotamiento PD1, TIM3 y LAG3 12 días después de la expansión celular iNKT no transducidas. De manera crítica, la evaluación de la expresión del marcador de agotamiento se realizó en células iNKT expandidas y no transducidas, pero no en células CAR-iNKT. Por lo tanto, el estado de la

expresión del marcador de agotamiento en las células CAR-iNKT generadas de acuerdo con el protocolo de la técnica anterior permanece sin definir.

8 *En vivo* actividad antitumoral

5 Los inventores han demostrado las células de la invención en un modelo de tumor murino de xenoinjerto NSG de linfoma, las células CAR iNKT generadas de acuerdo con el protocolo optimizado (protocolo 4) se inyectaron una vez en ratones portadores de linfoma y dieron como resultado una mejora significativa en la supervivencia general y libre de tumor en comparación a animales no tratados o animales tratados con células T CAR y iNKT o células T no transducidas (Figura 10).

10 De acuerdo con los datos publicados y de patentes, las células CAR iNKT derivadas del protocolo de la técnica anterior dieron como resultado un beneficio significativo en la supervivencia de los animales con linfoma y neuroblastoma en comparación con los controles no tratados; sin embargo, esto se asoció con el tratamiento concomitante de los animales con IL-2 intraperitoneal (1,000 U/ratón) cada 3 días, mientras que en otro experimento, la eficacia antitumoral contra el neuroblastoma experimental, requirió dosificaciones repetidas con células CAR iNKT46.

15 La dosificación repetida y uso de IL-2 *in vivo* para respaldar el efecto terapéutico de las células inmunitarias modificadas con CAR es muy inusual en el campo de la inmunoterapia con CAR y podría indicar una disminución de la aptitud de las células en estudio *in vivo*. No se pudo encontrar un informe publicado de inmunoterapia CAR en asociación con el uso de IL-2 *in vivo*. Cabe señalar que el uso de IL-2 en humanos está asociado con efectos secundarios potencialmente graves, tales como fiebre, escalofríos, dolores articulares y musculares. Otros efectos secundarios incluyen aumento de peso por los líquidos, frecuencia cardíaca acelerada, baja producción de orina, presión arterial baja, náuseas, vómitos, diarrea, enrojecimiento de la piel, picazón, sueños vívidos y confusión.

9 Persistencia *in vivo*

25 Los inventores han demostrado que, en un modelo de linfoma, los animales tratados con una sola inyección de células CAR iNKT sin IL-2 adicional mantuvieron la regresión del tumor y, en algunos casos, una segunda remisión, incluyendo después de la recaída cerebral (Figura 11), con >70 % de supervivencia general sin tumor de al menos 3 meses (14/19 ratones). Esto sugiere que las células CAR iNKT fabricadas de acuerdo con el protocolo optimizado de la invención (protocolo 4) han extendido persistencia *in vivo*, manteniendo intactas las funciones efectoras y ejerciendo una inmunovigilancia eficaz a largo plazo.

30 Por el contrario, los datos del estado de la técnica en un modelo de linfoma con una vida útil comparable al modelo de xenoinjerto, solo la fracción CD62L+ CAR-NKT, en asociación con la administración intraperitoneal concomitante de IL-2 cada 3 días, indujo una regresión tumoral sostenida, con supervivencia libre de tumor del 56% (5/9 ratones) a los 3 meses 45.

Si bien las ventajas descritas anteriormente se han ejemplificado con respecto a los protocolos específicos mencionados anteriormente, se apreciará que algunas o todas estas ventajas pueden obtenerse con respecto a cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento.

35 Ejemplo 2

Actividad antilinfoma mejorada de las células car19-inkt de doble especificidad

40 La inmunoterapia de células T con receptor de antígeno quimérico anti-CD19 (CAR19) produce remisiones clínicas en los linfomas de células B, pero a menudo son de corta duración. Dado que muchos linfomas coexpresan CD19 y CD1d, se probó si la modificación de CAR19 de las células NKT invariantes restringidas por CD1d (iNKT) daría como resultado una actividad antilinfoma mejorada. Se mostró que las células CAR19-iNKT se activan cooperativamente por las interacciones iTCR-CD1d y CAR19-CD19. En comparación con CAR19-T, las células CAR19-iNKT muestran una mayor actividad proliferativa y citotóxica, incluso contra las células de linfoma CD19+CD1d+ primarias. Los dominios de cromatina bivalentes, respaldados por la interacción de RAR α con EZH2, restringen la transcripción de CD1d. La desrepresión transcripcional de CD1d por el ácido transretinoico total (ATRA) da como resultado una mayor

45 citotoxicidad de las células CAR19-iNKT contra las células de leucemia linfocítica crónica (CLL). Finalmente, una actividad antilinfoma *in vivo* más rápida de las células CAR19-iNKT y su mayor capacidad para erradicar los linfomas cerebrales respaldan una supervivencia general y libre de tumores significativamente mejorada.

50 Por lo tanto, las células iNKT son una plataforma altamente eficiente para la inmunoterapia basada en CAR de linfomas y posiblemente otros cánceres que expresan CD1d y la modulación transcripcional de la expresión de CD1d puede mejorar aún más la eficacia de las células CAR-iNKT.

A pesar de la impresionante eficacia clínica temprana, la inmunoterapia con células CAR-T para las neoplasias malignas de células B está limitada por la recaída de la enfermedad y el escape del tumor por la regulación a la baja del antígeno CD19 comúnmente dirigido.

Las células iNKT son células T inmunorreguladoras y efectoras raras pero potentes con reactividad similar a la innata, que desempeñan un papel antitumoral fundamental. Están restringidas por CD1d, una molécula similar a I HLA no polimórfica que presenta glicolípidos expresada en células B, células presentadoras de antígenos y algunos tejidos epiteliales.

Anteriormente se descubrió que CD1d también se expresa en células B malignas CD19+ en linfomas, incluyendo los linfomas de zona marginal (MZL) y de células del manto (MCL). Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que equipar las células iNKT con CAR19 potencialmente lograría la doble orientación de CD1d y CD19 por el iTCR endógeno y el CAR19 respectivamente, mejorando así el efecto antilinfoma general. El trabajo anterior demostró la viabilidad de la modificación con CAR de las células iNKT y su actividad preclínica contra el neuroblastoma y las líneas celulares de linfoma de células B CD1d-CD19+. Sin embargo, queda por determinar cuál es la mejor manera de fabricar las células CAR-iNKT y no se ha probado la actividad de las células CAR-iNKT contra las células de linfoma derivadas de pacientes. Además, falta un análisis comparativo directo de las células CAR-T y CAR-iNKT y no se han abordado las contribuciones relativas de las interacciones TCR-CD1d frente a CAR19-CD19 en la activación de las células CAR19-iNKT.

Al probar 4 protocolos diferentes (Tabla 3), se descubrió que la selección inicial seguida de la transducción lentiviral CAR19 (Fig. 13a) de células iNKT (protocolo 4) genera constantemente células CAR19-iNKT (y CAR19-T) altamente transducidas (Fig. 12a), de hemoderivados frescos o congelados, de pacientes o de donantes sanos (Fig. 13b y c). En presencia de células B CD1d+, la capacidad de expansión significativamente mayor de las células CAR19-iNKT da como resultado productos celulares a escala clínica (Fig. 12b).

Es importante destacar que este enfoque garantiza la conservación de la fracción CD4- (Fig. 13e), que, en comparación con las células CD4+ iNKT, tiene un perfil de citoquinas Th1 más polarizado. De hecho, se encontró que las células CD4-CAR19-iNKT en reposo expresan niveles significativamente más altos de perforina y granzima B y, tras la activación, más granzima B e interferón- γ (IFN- γ), pero menos IL-4 que el subconjunto CD4+ (Fig. 12c y Fig. 13f). En comparación con sus contrapartes CAR19-T, una proporción significativamente mayor de células CAR19-iNKT expresan IFN- γ , perforina y granzimas (Fig. 12c), una proporción significativamente mayor son trifuncionales (Fig. 12d-f) y secretan niveles más altos de citoquinas TH1/2 durante un período de activación de 8 horas (Fig. 12g).

A continuación, se probó si equipar las células iNKT con un CAR19, que activa poderosamente las células T cuando se involucra con CD19, afectaría la funcionalidad del iTCR endógeno. Usando las células CD1d-CD19-K562 modificadas para expresar CD1d y CD19 individualmente o en combinación (Fig. 14a), se encontró que la matanza por parte de las células CAR19-iNKT de los objetivos CD1d+CD19-, CD1d-CD19+ y CD1d+CD19+ procedió de manera incremental (Fig. 12h). En presencia del agonista de células iNKT α -galactosilceramida (α -GalCer), se observó un aumento adicional de la citotoxicidad de las células CAR19-iNKT contra CD1d+ pero no contra objetivos de CD1d- (Fig. 14b). Por lo tanto, se concluyó que la participación de CAR19 no afecta la capacidad del iTCR endógeno para activar las células iNKT tras la interacción con CD1d. Estos hallazgos también respaldan la hipótesis de que la orientación dual de CD1d y CD19 da como resultado la matanza cooperativa de las células objetivo y puede mejorarse aún más con α -GalCer.

Por lo tanto, en contraste con los esfuerzos actuales que apuntan a eliminar el TCR endógeno para permitir el uso de 'listos para usar', el 3^{er} donante de células CAR-T sin riesgo de aGVHD, la inmunoterapia óptima de células CAR-iNKT requiere la preservación del iTCR. Dado que las células iNKT del donante protegen de aGVHD, la inmunoterapia con células CAR-iNKT también sería adecuada para el uso "listo para usar" sin necesidad de eliminación de iTCR.

A continuación se evaluó la reactividad en corto y largo plazo *in vitro* de células CAR19-iNKT en un contexto de células de linaje B. Primero, se confirmó que la citotoxicidad de las células CAR19-iNKT es proporcional al nivel de expresión de CD19 y CD1d en las células B maduras (Fig. 16a y b). El seguimiento del potencial proliferativo durante un período de 3 semanas mostró una expansión significativamente mayor de CAR19-iNKT sobre las células CAR19-T del mismo donante (Fig. 15a). Esto fue más llamativo para las células CAR19-iNKT frente a CAR19-T de 3^{ra} generación y se corroboró en ensayos de proliferación de obtención imágenes en tiempo real durante un período de 7 días (Fig. 15b), lo que sugiere que podría ser ventajoso usar iNKT en lugar de células T para el desarrollo clínico de los CAR de 3^{ra} generación. En los ensayos de citotoxicidad, se encontró una mayor reactividad de las células CAR19-iNKT que los efectores CAR19-T contra las células de linfoma de Farage y CD19+CD1d+ C1R-CD1, que se mejoró aún más con α -GalCer (Fig. 15c).

En un ensayo de imágenes de 7 días en tiempo real, se encontró un mayor potencial proliferativo de las células CAR19-iNKT sobre las células CAR19-T, acorde con una mayor citotoxicidad de las primeras contra los objetivos de CD1d+CD19+ (Fig. 15d y e), con una equivalencia funcional de CAR19- iNKT: CAR19-T de 10:1

Para reflejar mejor el contexto clínico, se establecieron ensayos de citotoxicidad utilizando como objetivos células de linfoma CD1d+CD19+ primarias de 1 paciente con una variante blástica de MCL y 2 pacientes con MZL, que coexpresan CD1d y CD19 como se informó anteriormente (Fig. 17a). En 6 de 7 ensayos con 3 donantes sanos, las células CAR19-iNKT fueron más citotóxicas que las células CAR19-T (Fig. 15f). La caracterización adicional de la matanza de células de linfoma mediante la evaluación del tamaño celular y la retención de 7-AAD (Fig. 17b) confirmó una matanza superior por parte de las células CAR19-iNKT de todas las células de linfoma del paciente (Fig. 17c y d).

En estos ensayos del 'mismo tubo' (Fig. 17b) también se observó una matanza baja o nula de monocitos, que expresan niveles altos de CD1d, pero no de CD19 (Fig. 17e), lo que sugiere un nivel bajo de "en el objetivo", 'reactividad "fuera del tumor" de las células CAR19-iNKT.

Las células CLL expresan CD1d bajo o nulo en comparación con las células B normales (Fig. 19a). Se encontró que las células CAR19-iNKT asesinaron efectivamente las células B CLL, con una mejora adicional en presencia de α -GalCer (Fig. 19b). El trabajo anterior demostró que la expresión de CD1d en células B humanas puede ser modulada por el ligando ATRA de RAR α . En consecuencia, se observó que la expresión de proteína de superficie celular y ARNm de CD1d aumentó de manera dependiente del tiempo después del tratamiento con concentraciones clínicamente relevantes de ATRA (Fig. 18a-c y Fig. 19c-e) sin afectar la viabilidad celular (Fig. 19f). Además, las células de LLC cargadas previamente con α -GalCer fueron asesinadas de manera más eficaz por las células CAR19-iNKT que por las células CAR19-T (Fig. 18d) y tras el tratamiento previo con ATRA de las células de LLC (Fig. 19g), la actividad citotóxica de las células CAR19-iNKT, pero no de las células CAR19-T aumentó aún más (Fig. 18d).

Se disecciono la base epigenética y transcripcional de la regulación de CD1d en la línea celular de mieloma U266 como paradigma de una célula maligna de linaje B con represión transcripcional de la expresión de CD1d (Fig. 19h). Usando ensayos ChIP y re-ChIP, se encontró un enriquecimiento de las marcas de histonas activadoras de H3K4me3 y represivas de H3K27me3 en el promotor CD1d (Fig. 18e y f). En particular, se observó un estado de histona bivalente similar en las células CLL primarias (Fig. 19i). En las células U266, también se demostró el enriquecimiento de la forma fosforilada de Ser5, pero no de Ser2 de ARNPolIII (Fig. 18g), consistente con un estado transcripcional bivalente equilibrado de *CD1D*. Es importante destacar que la bivalencia de histonas en el promotor *CD1D* se asoció con altos niveles de unión de RARA, así como de EZH2, la metiltransferasa del complejo polycomb responsable de las marcas H3K27me3 (Fig. 18h), con interacción directa de EZH2 y RARA (Fig. 18i), lo que sugiere una función represiva transcripcional cooperativa sobre CD1D. En un enfoque farmacológico, aunque un inhibidor de EZH2 no tuvo un efecto perceptible sobre la transcripción y la expresión superficial de CD1d, mejoró cooperativamente el efecto de ATRA sobre la expresión de CD1d (Fig. 18j-l). Estos hallazgos proporcionan la base mecánica para desarrollar la inmunoterapia con células CAR-iNKT junto con la manipulación transcripcional y epigenética de CD1d.

Finalmente, se compararon las células CAR19-iNKT vs CAR19-T de 2^{Da} generación en un modelo sistémico *in vivo* de neoplasia maligna de células B CD1d+CD19+ (células C1R-CD1d; Fig. 20a). Los animales tratados con células T o iNKT no modificadas tuvieron una supervivencia más pobre en comparación con los ratones que recibieron inmunoterapia basada en CAR (Fig. 20b). Sin embargo, en comparación con las células CAR19-T, el grupo tratado con células CAR19-iNKT mostró una supervivencia global significativamente mejorada (Fig. 20b; $p=0.01$) y libre de tumor (Fig. 20c; $p<0.001$). Esto podría explicarse, al menos en parte, por una disminución significativamente más rápida de la carga tumoral después de la transferencia adoptiva de células CAR19-iNKT (Fig. 20d y e). Cabe destacar que, mientras que, en informes anteriores, la actividad antitumoral de las células CAR-iNKT requería infusiones repetidas de células (neuroblastoma) o la administración de IL-2 *in vivo* (linfoma), en el presente documento se observó una excelente actividad anti-linfoma utilizando una dosis única de células CAR19-iNKT sin ningún tratamiento adyuvante.

El modelo de tumor, como se corroboró mediante BLI, IRM, espectroscopia de IRM y análisis histológico, se asoció con linfoma cerebral en la mayoría de los animales (Fig. 21a-d y Tabla 4). Si bien el linfoma cerebral persistió por encima del umbral de detección en todos los animales menos uno que recibieron células CAR19-T, así como en todos los animales no tratados, se eliminaron en 14/18 animales tratados con células CAR19-iNKT (Fig. 20f). Esto sugiere que las células CAR19-iNKT cruzan la barrera hematoencefálica y controlan eficazmente la enfermedad cerebral, una propiedad que podría tener un valor clínico significativo en la inmunoterapia del linfoma y otros cánceres cerebrales. En 4 ratones tratados con células CAR19-iNKT, después de la eliminación inicial del linfoma sistémico, se desarrolló una recaída, incluyendo la enfermedad cerebral, en una etapa posterior. Sorprendentemente, en los 4 ratones, esta enfermedad secundaria finalmente retrocedió, lo que llevó a una supervivencia a largo plazo (Fig. 20g y h y Fig. 22a-d) y consistente con la persistencia a largo plazo y la capacidad de respuestas antitumorales secundarias por parte de las células CAR19-iNKT.

En resumen, se proporciona la justificación celular y molecular para desarrollar células iNKT como una plataforma más eficaz y versátil que las células T convencionales para la inmunoterapia basada en CAR contra las neoplasias malignas del linaje CD1d+ B. Dado que, a diferencia de las células T alogénicas convencionales, las células iNKT alogénicas protegen de aGVHD, la inmunoterapia con células CAR-iNKT también sería adecuada para uso universal "listo para usar".

Tablas

Tabla 3. Resumen de 4 protocolos para la generación de células CAR-iNKT

Número de protocolo	Células de inicio	Expansión antes de la transducción	Activación antes de la transducción	Citoquina principal
1	Total MNCs	Sí	α GalCer	IL-2
2	6B11+ seleccionada	Sí	α GalCer-cargado iAPCs	IL-2
3	6B11+ seleccionada	No	perlas Anti-CD3/CD28	IL-15
4	6B11+ seleccionada	No	perlas Anti-CD3/CD28+ iAPCs	IL-15

MNC: células mononucleares; 6B11: mAb de TCR antivariante; iAPC: PBMC irradiadas, tal como células presentadoras de antígeno autólogas irradiadas

Tabla 4. Mediciones de IRM del tamaño de la glándula pituitaria y cuantificación MRSI de las proporciones Co/Crea y Cho/NAA

ID de Estudio	ID de Ratón	Tratamiento	Punto de tiempo	Glándula pituitaria	Co/Crea	Co/NA
			Día pos tumor (post tratamiento)	Volumen (mm ³)	a	A
				Media ± SEM		
Animales sanos						
1	F38	ninguno	44 de edad	2.200 ±0.140	0.042	0.023
2	F38	ninguno	58 de edad	2.217 ±0.031	0.000	0.000
3	F39	ninguno	44 de edad	2.011 ±0.178	0.063	0.096
4	F39	ninguno	58 de edad	2.344 ±0.041	0.000	0.000
Xenoinjertos de tumor						
5	F35	ninguno	29 (NA)	4.998 ±0.444	NA	NA
6	F35	ninguno	35 (NA)	9.946 ±0.254	3.750	NA
7	F33	T	29 (+18)	3.674 ±0.208	NA	NA
8	F32	iNKT	48 (+37)	4.720 ±0.109	1.396	0.737
9	F32	iNKT	54 (+43)	7.790 ±0.424	1.662	1.857
10	F32	iNKT	62 (+51)	28.200 ±0.150	66.194	8.800
11	F13	CART	32 (+21)	21.400 ±0.200	NA	NA
12	F37	CART	74 (+63)	6.382 ±0.235	1.346	0.750
13	F37	CART	89 (+78)	7.429 ±0.033	7.343	3.980
14	F4	CART	68 (+57)	4.113 ±0.066	1.198	0.636
15	F25	CART	90 (+79)	4.602 ±0.466	2.675	2.174
16	F27	CART	90 (+79)	3.387 ±0.495	2.093	3.788
17	F7	CARiNKT	90 (+79)	2.138 ±0.068	0.000	0.000
18	F9	CARiNKT	90 (+79)	2.740 ±0.021	0.000	0.000

Co: colina; Crea: creatina; NAA, N-acetilaspártato; NA: no disponible

Métodos

Vectores y constructos

Para generar células CAR iNKT y T específicas de CD19, se modificaron constructos de CAR de 19-IgGFC-CD28OX40ζ de 2^{da} generación y 19-IgGFC-CD28ζ de 3^{ra} generación, amablemente donadas por el Dr. Martín Pule, University College London, para eliminar los dominios extracelulares CH2 y CH3 y se clonaron de nuevo en el vector lentiviral pSew mediante PCR superpuesta utilizando el ensayo de Gibson (NEB). La estructura modular final se proporciona en la Fig. 13a. El gen de marcador RQR8/suicidio²² se mantuvo corriente arriba de los CAR con un péptido FMD-2A intermedio para permitir la detección temprana de células transducidas con CAR como se describió anteriormente. Para generar células de expresión única o doble de CD19 y CD1d, se clonaron individualmente o junto con un fragmento de FMD2A interpuesto dos secuencias codificantes para CD19 y CD1d humanos, obtenidas del Dr. Martín Pule y el Prof. Vincenzo Cerundolo, University of Oxford, respectivamente en un vector SFG retroviral. A los efectos de la monitorización *in vitro* en tiempo real de la actividad citotóxica de las células CAR, se generaron objetivos de células B CD1d+ marcadas con mCereza mediante el uso de un plásmido lentiviral pHR-SIN que codifica una

proteína de fusión hCD1d-mCereza (prof. Vincenzo Cerundolo). Para detectar células tumorales y monitorizar el crecimiento del tumor *in vivo*, la luciferasa de luciérnaga se coexpresó con la proteína fluorescente roja tdTomate (tdRFP) en un solo vector SFG como se describió anteriormente.

Células primarias

- 5 Se obtuvieron muestras de sangre periférica (PB) y linfátesis de voluntarios sanos, así como muestras de PB de pacientes con linfoma de células del manto (MCL), linfoma de la zona marginal (MZL) y leucemia linfocítica crónica (CLL) después del consentimiento informado por escrito y la aprobación del comité de ética de la investigación (Research Ethics Committee reference: 11/H0308/9). Las células mononucleares de PB (PBMC) se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad y se usaron como fuente de células linfoides CD3+ para la modificación CAR
- 10 o de células tumorales CD19+ orientadas a ensayos funcionales. Para generar células CAR iNKT, se purificaron inmunomagnéticamente linfocitos TCRV α 24Ja18+ a partir de PB y células mononucleares de aféresis utilizando microesferas iNKT antihumanas (Miltenyi Biotec).

Líneas celulares

- 15 Las K562 se obtuvieron de ATCC, mientras que las líneas celulares ARH-77, KMS12, H929 y U266 se compraron de DSMZ. Las líneas celulares C1R y C1R-CD1d fueron proporcionadas por el profesor Cerundolo. La línea celular Farage fue amablemente donada por el Prof. Ronald Gartenhaus de la University of Maryland School of Medicine, Baltimore. Se analizó la contaminación por micoplasma de todas las líneas celulares utilizando el kit de detección de micoplasma MycoAlert (Lonza). Las líneas celulares K562, C1R y ARH-77 se transdujeron para expresar el CD19 y/o CD1d humano. Con el propósito de ensayos funcionales *in vitro*, las células ARH-77 también se modificaron con el plásmido pHR-SIN descrito anteriormente para coexpresar la proteína fluorescente roja mCereza junto con CD1d+. La
- 20 línea celular C1R-CD1d se modificó con el plásmido luciferasa-tdRFP para monitorización *in vitro* e *in vivo* por formación de imágenes de fluorescencia y bioluminiscencia (BLI) respectivamente.

Agentes farmacológicos

- 25 Se adquirieron α -galactosilceramida (KRN7000, Cambridge Bioscience), ácido retinoico todo trans (ATRA, Sigma-Aldrich) y el inhibidor de EZH2 GSK343 (Sigma-Aldrich) en forma liofilizada. Las soluciones madre se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% a 1 mg/ml (0.001 M), 3 mg/ml (0.01 M), 15 mg/ml (0.03 M) respectivamente. La solución de DMSO de α -galactosilceramida (α GalCer) se disolvió completamente mediante calentamiento a 80° durante 1 hora, se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso. Antes del uso, se preparó una solución de trabajo calentando durante otros 60 segundos a 80°C, seguido de dilución en PBS a 100 μ g/ml (1000x). Se usaron
- 30 ATRA y GSK343 para evaluar la regulación transcripcional de CD1d en células CLL primarias y la línea celular U266. La solución de ATRA en DMSO se preparó recientemente antes de cada experimento, se protegió de la luz y se diluyó en PBS a 1 mM (1000X) para uso inmediato. La solución madre de GSK343 se almacenó a -20 °C y se diluyó en PBS a 1 mM (1000x) antes de su uso. Las células de CLL se trataron con 10⁻⁶M ATRA. Las células U266 se recogieron durante su crecimiento exponencial y se trataron con 10⁻⁶ M ATRA o 10⁻⁶ M GSK343 o una combinación de ambos. Se
- 35 usó DMSO al 0.01% como control. En todos los casos, las células se incubaron durante un máximo de 96 horas antes de proceder a RT-PCR, la citometría de flujo y los ensayos ChIP/re-ChIP en los puntos de tiempo indicados.

Constructos de vectores retrovirales y lentivirales, producción y transducción viral

- Se generaron retrovirus y lentivirus pseudotipados VSV-G mediante la transfección de células HEK293T confluentes al 80 % (ATCC) con los plásmidos de transferencia, empaquetamiento y envoltura utilizando el método CaCl₂. Se
- 40 utilizaron pCMV-Gag-Pol y pVSV-G para retrovirus, o pRsv-REV, pMDlg-pRRE y pMD2G para lentivirus respectivamente. El sobrenadante del virus se cosechó a las 48 y 72 h después de la transfección, se centrifugó y filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.45 μ m, se concentró por ultracentrifugación a 23,000 $\times$ g 4 °C durante 120 min y se resuspendió con medio 1 $\times$ RPMI 1640 (Sigma-Aldrich). Las líneas celulares se transdujeron con retrovirus en presencia de 8 μ g/ml de polibreno (Sigma-Aldrich). Dos días después, se determinó la eficacia de la
- 45 transducción mediante citometría de flujo como porcentaje de células CD19+ y/o CD1d+ o células tdRFP+. Cuando fue necesario, las células positivas se clasificaron mediante selección inmunomagnética o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y se expandieron aún más en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Gibco) y penicilina-estreptomina al 1 % (Pen/Strep, Stem Cell Tecnologías) (medio de cultivo estándar). Para generar células iNKT modificadas con CAR, se sembraron células clasificadas con 6B11 en una proporción de
- 50 1:1 con células mononucleares autólogas irradiadas (3500 rad) (iAPC, ejemplos de PBMC irradiadas). Se usó un número igual de células mononucleares del mismo donante como fuente de células T convencionales. A continuación, los linfocitos T e iNKT se activaron con Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher) en una proporción de microesferas por célula de 1:1 en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 % y Pen/Strep al 1 % con IL-15 30 UI ml⁻¹ (Miltenyi Biotec) a una densidad de 1-5 $\times$ 10⁴ células por ml. Se transdujeron células T e iNKT activadas a
- 55 2-5 MOI en presencia de 4 μ g/ml de polibreno. Dentro de los 4 días posteriores a la transducción, se evaluó la viabilidad y la expansión de las células mediante azul tripán, así como la pureza mediante citometría de flujo. La eficiencia de transducción se determinó mediante citometría de flujo como porcentaje de células RQR8+ como se describió anteriormente²². Cuando fue necesario, las células positivas se clasificaron mediante selección inmunomagnética con microperlas anti-CD34 (Miltenyi), se volvieron a colocar en placa a la misma densidad y se reestimularon con células

C1R-CD1d irradiadas 1:1, IL-15 30 UI/ml de y α GalCer 100 ng /ml. Después de 7 días, se volvió a evaluar la expansión de las células con azul de tripano y la pureza mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-ratón de cabra F(ab')₂ (Invitrogen) y se cambió a un medio bajo en IL-15 hacia la fase de reposo antes de los estudios funcionales. Alternativamente, las células se mantuvieron con 100 UI/ml de IL-2 y/o IL-15 y se recolectaron durante la fase de crecimiento exponencial antes de la crioconservación.

Anticuerpos y tinción intracelular

Las células CAR⁺ se identificaron utilizando el anticuerpo monoclonal (MoAb) anti-humano APC-CD34 o FITC-CD34 (QBend10, Abcam) de ratón contra el marcador RQR8 o el fragmento FITC-F(ab')₂ anti-ratón de cabra (Invitrogen) contra la bisagra del CAR. Para el fenotipado de células T, se usaron los siguientes anticuerpos: ratón antihumano PerCP-Cy5.5-CD3 (OKT3, eBioscience), Pe-Cy7-CD8 (RPA-T8, eBioscience) y eFluor450-CD4 (OKT4, eBioscience). Las células iNKT se definieron como células T TCRV α 24⁺, TCRV β 11⁺, TCRV α 24J α 18⁺ utilizando combinaciones por pares de PE-TCRV α 24 antihumano de ratón (C15, Beckman Coulter), APC-TCRV β 11 (C21, Beckman Coulter) o FITC-TCRV α 24J α 18⁺ (6B11, eBioscience). Se registró un mínimo de 0.5×10^6 células CD3⁺ o 200 células iNKT para facilitar el cálculo preciso de las frecuencias totales de células CD4⁺ y CD4-iNKT. Para el perfil de citoquinas intracelulares, las células T se fijaron y permeabilizaron con el kit BD Cytofix/Cytoperm Plus según la recomendación del fabricante, seguido de tinción con eFluor450-CD3 antihumano de ratón (UCHT1, eBioscience), PerCP-eFluor710-CD4 (SK3, eBioscience), BUV395-CD8a (RPA-T8, eBioscience), FITC-Perforina (*d*-G9, eBioscience y B-D48, 2BScientific), PE-GranzymeB (GB11, eBioscience), APC-IFN γ (4S.B3, eBioscience), PE-IL-2 (MQ1-17H12, eBioscience), PeCy7-IL-4 (8D4-8, eBioscience) y APC-eFluor780-IL17A (eBio64DEC17, eBioscience). El perfil de citoquinas se evaluó en células en reposo y tras estimulación durante 4 horas con Dynabeads (1:1) o PMA/ionomicina (eBioscience) o células C1R CD1d (1:1) en presencia de Monensin y Brefeldin (eBioscience).

Ensayos multiplex de cuantificación de citoquinas

Las células modificadas con CAR se estimularon durante 3 y 8 horas con Dynabeads en una proporción de 1:1. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron con un inmunoensayo Human ProcartaPlex (Invitrogen) usando el ensayo Luminex de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayos de proliferación

Hasta 10^4 células C1R-CD1d irradiadas se sembraron en microplacas de 96 pocillos de fondo plano recubiertas con poli-L-ornitina. Cuando fue necesario, se agregó α GalCer o vehículo durante 4 horas antes de agregar hasta 10^4 células modificadas con CAR en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %, Pen/Strep al 1 % y IL-15 20 UI ml⁻¹. La placa de células se mantuvo a 37 °C y 5 % de CO₂ en el instrumento IncuCyte ZOOM[®] (Sartorius) hasta por una semana sin más manipulación. La proliferación de células CAR fue determinada por el software IncuCyte[™], con un escaneo de 24 horas programado cada 1 hora con objetivos de 10x o 4x y utilizando el algoritmo de confluencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante (protocolo EssenBio 8000-0331-A00).

Monitorización *in vitro* en tiempo real de la actividad citotóxica de las células CAR

Las células ARH-77 transducidas con CD1d-mCereza se sembraron en una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo de fijación ultrabaja (ULA) (Corning) con medio de cultivo estándar a una densidad de 500 células/pocillo y se dejó reposar durante 1 hora. A continuación, las células efectoras se resuspendieron en medio estándar con IL-15 20 UI ml⁻¹ y añadido en la proporción indicada por triplicado. Los pocillos con objetivos solos y efectores se incluyeron como controles. La microplaca se mantuvo a 37 °C y 5 % de CO₂ en el instrumento IncuCyte ZOOM[®] por hasta una semana sin más manipulación y escaneado usando una fase y un canal rojo cada 1 hora con objetivo 10x durante las primeras 48 horas y objetivo 4x desde el día 3 hasta el final del experimento. Las células objetivo se controlaron como objetos fluorescentes rojos y se cuantificaron con software IncuCyte[™] usando fluorescencia de imagen media roja (MIF) y área de fluorescencia roja (μ m²/imagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (protocolo EssenBio 8000-0330-B00). La proliferación de células CAR se determinó como se describe en el párrafo "Ensayo de proliferación a largo plazo".

Ensayos de citotoxicidad

Los objetivos marcados con violeta CellTrace[™] (Invitrogen) se incubaron en las proporciones indicadas con células efectoras durante 3 horas. Como controles, se incubaron simultáneamente objetivos y efectores solos para determinar la muerte celular espontánea. Cuando se indique, los objetivos se preincubaron con α GalCer o vehículo a 37 °C durante 4 horas antes de la adición de las células efectoras. A continuación, se recogieron las células y se añadió 7-AAD antes del análisis de citometría de flujo en el citómetro de flujo BD Fortessa, utilizando el software BD FACSDiva versión 6.0. La actividad citotóxica específica se determinó como ((% muestra (7-AAD⁺, violeta⁺) - % espontáneo (7-AAD⁺, violeta⁺)) / (100 - % espontáneo (7-AAD⁺, violeta⁺))) x 100. Todos los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado. El análisis de datos se realizó con FlowJo 10.2.

Análisis de expresión génica

El ARN total de las células CLL primarias y la línea celular U266 se extrajo con el kit de ARN NucleoSpin (Macherey Nagel), seguido de la síntesis de ADNc con el kit de síntesis de ADNc de primera cadena RevertAid (Thermo Fisher Scientific), según las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de la expresión génica, se realizó RQ-PCR del ADNc plantilla por triplicado en sistema de PCR StepOnePlus™ en tiempo real que utiliza mezcla maestra y ensayos de expresión génica Taqman (Applied Biosystems). Los niveles de transcripción de *CD1d* se determinaron en relación con los genes de referencia *ACTS* y *GAPDH*, utilizando el método $\Delta\Delta CT$. Las sondas Taqman fueron *CD1D* Hs00939888_m1, *ACTB* Hs99999903_m1 y *GAPDH* Hs03929097_g1.

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) combinada con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (ChIP-RQ-PCR) se realizó para anti-H3K4me3, anti-H3K27me3, anti-ARN polimerasa II CTD fosfo Ser2, anti-ARN polimerasa II CTD fosfo Ser5, anti-EZH2, anti-RAR α y control IgG como se describió anteriormente²⁵. Para los ensayos Re-ChIP, los pasos de elución de cromatina y lavado de la primera IP se realizaron con tampones que contenían inhibidores de proteasa y la primera elución se realizó incubando las perlas magnéticas en DTT/TE 10 mM durante 30 min a 37 °C. El eluato de la primera IP se diluyó al menos 20X en tampón de dilución ChIP, seguido de una segunda IP de acuerdo con el mismo protocolo que el anterior. Se calculó la expresión del ADN inmunoprecipitado, ya sea en relación con el ADN de entrada o el ADN inmunoprecipitado por el anticuerpo IgG de control, utilizando el método $\Delta\Delta CT$.

Cebadores de ChIP

Para los experimentos con células U266, se diseñaron cebadores ChIP para analizar el elemento regulador corriente arriba del gen *CD1D*, aproximadamente a 1.5 kb del sitio de inicio de la traducción ATG, en consonancia con la ubicación notificada del RARE. Como controles, también se evaluaron las regiones reguladoras corriente arriba de *HOXA2*, un objetivo putativo de la represión mediada por polycomb, que se sabe que está marcado por modificaciones de histonas bivalentes, y *GAPDH*, como gen de limpieza transcripcionalmente activo. Los pares de secuencias de cebadores utilizados fueron: *CD1D* 5'-CCCTGAGAAAGTGACCTTG (SEQ ID NO: 1) y 5'-TGGCTGTTAGCTTTTCAGTTCC (SEQ ID NO: 2), *GAPDH* 5'-CCGGGAGAAGCTGAGTCATG (SEQ ID NO: 3) y 5'-TTTGCGGTGGAATGTCCTT (SEQ ID NO: 4), *HOXA2* 5'-AGGAAAGATTTTGGTTGGGAAG (SEQ ID NO: 5) y 5'-AAAAAGAGGGAAAGGGACAGAC (SEQ ID NO: 6). Para los experimentos con células CLL primarias, se diseñaron 3 conjuntos de cebadores para analizar 2 regiones aguas arriba del codón de inicio ATG en -3047 (distal, DP) y -1240 (proximal, PP) y 1 región dentro del exón 2 en +382 (I2P). Las secuencias correspondientes fueron: DP 5'-TGGACGTCCGAGAGGTAAGAG (SEQ ID NO: 7) y 5'-CACAGTAACCTGGAGATCCACTA (SEQ ID NO: 8), PP 5'-AATGATGCTGGGGTGTGAGG (SEQ ID NO: 9) y 5'-GCACGGCCTGCAAGATTATG (SEQ ID NO: 10), I2P 5'-CTCCAGATCTCGTCCTTCGC (SEQ ID NO: 11) y 5'-CTGGGACCAAGGCTTCAGAG (SEQ ID NO: 12).

Modelo de tumor de xenoinjerto sistémico

Se manipularon ratones NOD/SCID/IL-2Ry-null (NSG) de 6 semanas de edad de acuerdo con la Animal Scientific Procedures Act de 1986 y bajo una licencia de proyecto aprobada por el United Kingdom Government Home Office. Los animales se alojaron en las instalaciones de Hammersmith Central Biomedical Services (CBS), Imperial College London. El día 0 todos los animales recibieron 5×10^6 células C1R-CD1d que expresan luciferasa mediante inyección en la vena de la cola (iv), seguido de monitorización por imágenes de bioluminiscencia (BLI) dos veces por semana. Tras la confirmación del injerto definido sobre la base del aumento de la señal de fotones en dos escaneos consecutivos realizados con 72 horas de diferencia, el día 11 los ratones se aleatorizaron para no recibir tratamiento o inmunoterapia con células T, iNKT, CAR19-T de 2^{da} generación o CAR19-iNKT de 2^{da} generación generadas a partir del mismo donante. A partir de entonces, BLI se realizó dos veces por semana hasta el día 21 y semanalmente hasta el final del experimento en el día 90. Los criterios de valoración primarios fueron la supervivencia global y la supervivencia libre de tumor. El criterio de valoración secundario fue la supervivencia libre de tumor cerebral. Todos los ratones se sacrificaron de acuerdo con el protocolo cuando se alcanzaron los puntos finales experimentales o humanitarios.

Imágenes de bioluminiscencia (BLI)

Las imágenes de bioluminiscencia se recogieron en un sistema de imágenes IVIS Lumina XR III utilizando el software Living Image (PerkinElmer). Antes de obtener imágenes, los ratones se anestesiaron y mantuvieron bajo anestesia por inhalación a través de un cono nasal con isoflurano al 2 % (Zoetis UK) /oxígeno médico. Todos los ratones recibieron una única inyección intraperitoneal (IP) de 150 mg/kg de D-luciferina (Goldbio) en PBS 10 minutos antes del escaneo. Se tomaron imágenes de hasta tres ratones simultáneamente en un campo de visión (FOV) de 12.5 cm con un recuento mínimo de objetivos de 30,000 y tiempos de exposición que oscilaron entre 0.5 y 2 minutos en intervalos medios, con imágenes adicionales adquiridas en niveles de intervalos bajos para maximizar la sensibilidad y la resolución espacial donde sea requerido. Se adquirieron escaneos tanto ventrales como dorsales para cada ratón. Las señales dorsal y ventral se cuantificaron por separado a través del análisis de la región de interés (ROI) utilizando el software Living Image y se expresaron en luminosidad (unidad de fotones/seg/cm2/sr) como una suma de señal total normalizada al área de ROI. Cuando fue necesario, se restó la señal de fondo normalizada de ROI de tamaño similar.

Formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) y formación de imágenes espectroscópicas (MRSI)

Los tumores cerebrales fueron evaluados y monitorizados con IRM y MRSI en 12 animales. Todos los escaneos de IRM se realizaron en un escáner preclínico de 9.4 T (94/20 USR Bruker BioSpec; Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania) alojado en el Biological Imaging Centre, Imperial College London. Los ratones se anestesiaron como se describió anteriormente y se colocaron boca abajo en una cama especial para ratones provista de una esterilla térmica de agua caliente circulante para controlar la temperatura corporal. La respiración y la temperatura corporal se monitorizaron continuamente (1030-MR, SA Instruments, Stony Brook, NY, EE. UU.) y la cantidad de isoflurano y el calor administrado se ajustaron a través de escaneos IRM para mantener la frecuencia respiratoria dentro del intervalo de 35 a 45 respiraciones por minuto y la temperatura corporal a 36.5 °C. Las imágenes de los cerebros se adquirieron con Paravision 6.01 (Bruker, BioSpin) utilizando una bobina de cuadratura de transmisión de volumen de 86 mm de diámetro interno combinada con un receptor de matriz de cerebro de ratón desacoplado activamente. Los conjuntos de datos de imágenes consistieron en secuencias FLASH ponderadas en T₁ y RARE ponderadas en T₂ en orientación sagital, axial y coronal obtenidas dentro de los 10 minutos y 25 minutos respectivamente después de la inyección iv de Gadovist (gadobutrol, Bayer). El agente de contraste se diluyó en solución salina al 0.9 % y se usó a una concentración de 0.3 mmol/kg en todos los ratones excepto en 1. Para las imágenes T₁ FLASH se aplicaron los siguientes ajustes: T₁ sagital: TR/TE = 250/2.6ms; campo de visión = (18 × 14) mm², en resolución espacial plana (58 × 56) μm², espesor de corte de 500 μm, espacio entre cortes de 10 μm, 20 cortes, tiempo de escaneo 6 min 30 s; T₁ axial: TR/TE=320/2.6ms; campo de visión = (16 × 14) mm², en resolución espacial plana (62 × 61) μm², espesor de corte de 500 μm, espacio entre cortes de 10 μm, 30 cortes, tiempo de escaneo 6 min 30 s, T₁ coronal: TR/TE = 200/3 ms, FOV = (14 × 16) μm², en resolución plana (34 × 62) μm², espesor de corte de 500 μm, espacio entre cortes de 50 μm, 10 cortes. Tiempo de escaneo 3 min 50 s. Imágenes T₂ RARE se generaron con: T₂ sagital: TR/TE = 3000/40 ms, FOV = (18 × 14) mm², en resolución espacial plana (70 × 55) μm², espesor de corte de 500 μm, espacio entre cortes de 10 μm, 20 cortes, tiempo de escaneo 5 min. T₂ axial: TR/TE = 2500/45 ms, FOV = (14 × 14) μm², en resolución plana (55 × 55) μm², espesor de corte de 700 μm, espacio entre cortes de 50 μm, 12 cortes. Tiempo de escaneo 4 min. T₂ coronal: TR/TE = 3600/40 ms, FOV = (18 × 14) mm², en resolución espacial plana (70 × 55) μm², espesor de corte de 500 μm, espacio entre cortes de 10 μm, 30 cortes, tiempo de escaneo 6 min. Todas las imágenes se analizaron utilizando el software OsiriX. Para MRSI, el voxel se colocó dentro de la glándula pituitaria evitando la inclusión del tejido circundante. Calce basado en mapa de campo (hasta 4^{to} orden) se realizó antes de la adquisición de MRS para optimizar la homogeneidad del campo principal en el voxel de interés. Se adquirieron espectros de voxel único (SVS) en tiempos de eco largos y cortos (LTE y STE respectivamente), con: PRENSA LTE: TR/TE = 2500/100 ms, tamaño de voxel (2 × 1.2 × 1.35) mm³, tiempo de escaneo total 13 min 20 s; VAPOR STE: 2500/3 ms, tamaño de voxel (2 × 1.2 × 1.35) mm³, tiempo de escaneo total 13 min 20 s. La cuantificación relativa de las relaciones Creatina/NAA, Colina/NAA se calculó a partir de los espectros LTE. Los espectros se preprocesaron (faseados, apodizados) y luego cuantificados usando AMARES (software JMRUI).

Estadísticas

El análisis estadístico se realizó en el software GraphPad Prism 7. Para las comparaciones entre dos grupos, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, con corrección para múltiples pruebas t de acuerdo con el método de aumento de dos etapas de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Para la comparación entre más de dos grupos, se realizó cualquiera de las siguientes pruebas de acuerdo con el número de variables: Friedman no paramétrico con prueba de Dunn post-hoc (una variable) o ANOVA de dos vías ajustado por Tukey (más de una variable). La supervivencia se calculó utilizando el método de Kaplan-Meier, con análisis de intervalo logarítmico para comparar la supervivencia entre grupos. Todos los datos experimentales se presentan como media ± s.e.m. Todos los valores P dados son valores de dos colas. Un valor de P por debajo de 0.05 se consideró significativo.

Disponibilidad de datos

Todos los datos relevantes generados y analizados durante el estudio actual se han incluido en este manuscrito y en el material complementario.

Texto adicional sobre figuras seleccionadas

Figura 2: Gráficos representativos de células iNKT transducidas de acuerdo con los protocolos 1-4. Véase la descripción proporcionada en la Tabla 2. El histograma en C muestra el % de recuperación de células CD4-CAR-iNKT en relación con su frecuencia original anterior a la transducción.

Figura 4: expansión celular iNKT a partir de muestras de baja pureza (<80 %).

Figura 5: Transducción CAR19 de células iNKT seleccionadas inicialmente. A. Ejemplo representativo de la transducción de CAR19 de 3^{ra} generación de células iNKT seleccionadas de células mononucleares de sangre periférica fresca de un paciente con linfoma activo. La selección, la transducción CAR y la expansión según el protocolo 4 dieron como resultado >90 % de células iNKT transducidas con CAR. En el panel inferior, las células CD19+ representan células de linfoma circulantes. B. Ejemplo representativo de transducción CAR de células iNKT seleccionadas de linfátesis de sangre periférica congelada de un individuo sano. Se muestra la misma transducción CAR derivada del donante para CAR19 de 2^{da} y 3^{ra} generación. En estos diagramas de puntos FACS, las células iNKT

son TCRV α 24+V β 11+, las células T son TCRV α 24-, mientras que las células transducidas con CAR se identifican como aquellas que expresan el fabricante de superficie RQR8 (B) o mediante tinción con anticuerpo anti-F(ab)2 (A).

Figura 7: A. Las células CD4neg CAR19iNKT en reposo expandidas expresan niveles más altos de Perforina y granzima B en reposo. B. Las células CD4-CAR19iNKT estimuladas expresan niveles significativamente más altos y bajos de interferón-gamma e IL-4 respectivamente que las células CD4pos CAR19iNKT.

Figura 8: Citotoxicidad dual y cooperativa de células CAR iNKT. Izquierda. Las células K562 parentales no expresan CD1d o CD19 según lo evaluado por citometría de flujo. La transducción del ADNc del gen correspondiente generó líneas celulares que expresaban niveles comparables de CD1d y CD19 individualmente o en combinación. Derecha. Actividad citotóxica cooperativa de células CAR19 iNKT de 2^{da} generación contra los objetivos que se muestran a la izquierda.

Figura 9: Marcador de agotamiento PD1 en células CAR19 iNKT. Usando el protocolo óptimo 4, <20% de células CAR19 iNKT de 2^{da} y 3^{ra} generación expresan el marcador de agotamiento de células T PD1 según lo evaluado por citometría de flujo. Datos representativos de 2 experimentos.

Figura 10: Actividad antilinfoma de las células CAR19 iNKT in vivo. A. Diseño experimental. La línea de células B C1RCD1d se inyecta en ratones NSG antes de la inmunoterapia. B. Escaneos de BLI representativos (izquierda) y carga tumoral (derecha) evaluadas en los días 0 y 3 después de la inmunoterapia. C. Supervivencia global (n=10-19 ratones por grupo).

Figura 11: Regresión de tumor cerebral en ratones tratados con CAR19 iNKT. A. La recaída del tumor en el cerebro se eliminó en animales tratados con CAR19 iNKT sin necesidad de inyecciones adicionales de células CAR19 iNKT e IL-2. Es de destacar que la recaída de la enfermedad ocurrió el día 26, mientras que la remisión completa se confirmó el día 68 mediante BLI (izquierda) y el día 90 mediante histología (derecha), lo que sugiere que CAR iNKT es capaz de persistencia e inmunovigilancia a largo plazo. B. Por el contrario, las células CAR19T no pudieron eliminar las células tumorales en los ratones receptores de CAR19T, que finalmente murieron debido a la progresión del tumor.

REIVINDICACIONES

1. Un método para transducir y expandir una población de células iNKT, comprendiendo el método, en orden:

- un paso de selección de células iNKT;
- un paso de activación previa a la transducción;

5 • un paso de transducción celular para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR); y

- una fase de expansión celular;

en el que al menos el paso de transducción celular y la fase de expansión comprenden la incubación de las células iNKT con IL-15.

10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso de activación previa a la transducción también comprende la incubación de las células con IL-15.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se proporciona IL-15 a una concentración de aproximadamente 30 UI/ml dentro de un medio en el que se efectúa la activación previa a la transducción.

15 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paso de activación previa a la transducción comprende la activación por incubación de las células iNKT que se van a transducir con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paso de activación previa a la transducción se practica entre 12 y 24 horas antes del paso de transducción.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más pasos o fases adicionales, seleccionados independientemente del grupo que consiste en:

20 • un paso de enriquecimiento de linfocitos;

- un paso de selección de células transducidas;

- un paso de activación de célula transducida; y

- una fase de expansión celular adicional.

25 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se usa un paso de selección de células iNKT para producir una población de células que comprende al menos 80% de células iNKT.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el paso de enriquecimiento de linfocitos se realiza antes del paso de selección de células iNKT.

9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paso de activación previa a la transducción se realiza dentro de las dos horas posteriores a la finalización del paso de selección de células iNKT.

30 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paso de transducción de células se realiza dentro de las 24-36 horas desde el final del paso de selección de células iNKT.

11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende un paso de activación celular transducida, y la fase de expansión celular tiene una duración de entre 5 y 7 días.

Tabla 1. Cuatro protocolos diferentes para la transducción CAR de células iNKT.

	Tipo de célula inicial	Expansión previa a la transducción CAR	Modo de estimulación	Citoquina	Protocolo equivalente
1	PBMC	Sí	α GalCer	IL-2	no publicado
2	iNKT seleccionado	Sí	iAPC cargado con α GalCer	IL-2	Metelitsa et al.
3	iNKT seleccionado	No	Perlas anti-CD3/CD28	IL-15	no publicado

	Tipo de célula inicial	Expansión previa a la transducción CAR	Modo de estimulación	Citoquina	Protocolo equivalente
4	iNKT seleccionado	No	perlas anti-CD3/CD28 + iAPC	IL-15	no publicado
PBMC: células mononucleares de sangre periférica					
iAPC: PBMC irradiadas, tales como PBMC autólogas irradiadas					
α GalCer: α -galactosilceramida					

Tabla 2. Optimización del protocolo para modificación CAR de células iNKT.

#	Principales características	Ventajas	Inconvenientes	Pasos de optimización
1	Expansión de MNC antes de la transducción		Expansión limitada de iNKT en presencia de células T convencionales (Figura 2A, <i>panel 2</i>) Pérdida de la fracción de células iNKT tras la transducción (Figura 2A, <i>panel 3</i>) Baja eficiencia de transducción 3% (1%-8%, n=4) (Figura 2A, <i>panel 4</i>)	Selección inicial
2	Selección inicial Expansión con iPBMC autólogas + αGalCer + IL-2 manipulación in vitro (IL-2) cada 2-3 días Reestimulación después de ≥ 10 días con PBMC autólogas pulsadas con αGalCer irradiadas o aAPC Transducción 2 semanas después de la selección	Células iNKT puras después de la primera ronda de expansión Manipulación prolongada de sesgo de CD4+ (Figura 2B, <i>panel inferior izquierdo</i>) Figura 2B, <i>panel inferior izquierdo</i>)	Manipulación <i>in vitro</i> Muerte celular (Figura 2D, <i>panel 4</i>)	Transducción inicial
3	Selección inicial (>80% 6B11+) Preactivación rápida con aCD3/CD28	Mayor eficiencia de transducción (62%, 35-91%, n= 11, Figura 2D, <i>panel 3</i>)	Muerte celular (Figura 2D, <i>panel 4</i>)	Preactivación con: 1. Perlas aCD3/CD28, 2. APC

#	Principales características	Ventajas	Inconvenientes	Pasos de optimización
	Transducción dentro de las 24-48 horas posteriores a la selección			3.IL-15 MOI bajo
4	Selección inicial (>80% 6811+)	Mayor eficiencia de transducción		
	Preactivación rápida con	(77%, 61-99%, n=6, Figura 2C, <i>panel inferior izquierdo</i>)		
	· perlas aCD3/CD28,	Mayor viabilidad y capacidad de expansión.		
	· PBMC irradiadas, tal como iPBMC autólogas	Componente CD4-conservado (Figura 2C, <i>panel inferior derecho</i>)		
	· IL- 15	Manipulación in vitro mínima		
	Transducción dentro de las 24-48 horas posteriores a la selección	Virus mínimo requerido		

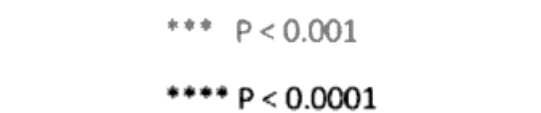


Figura 2A

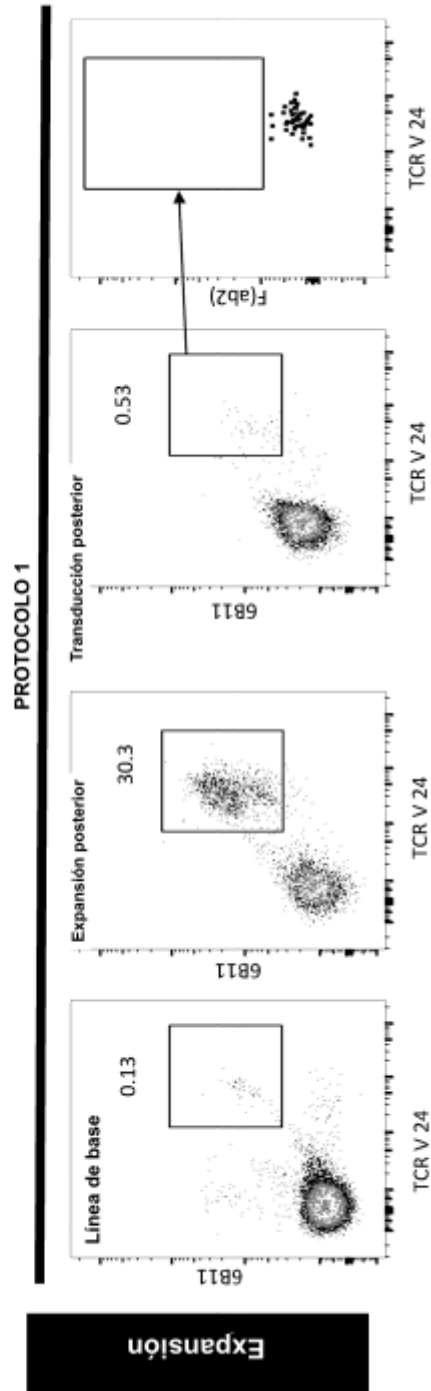


Figura 2
continuación

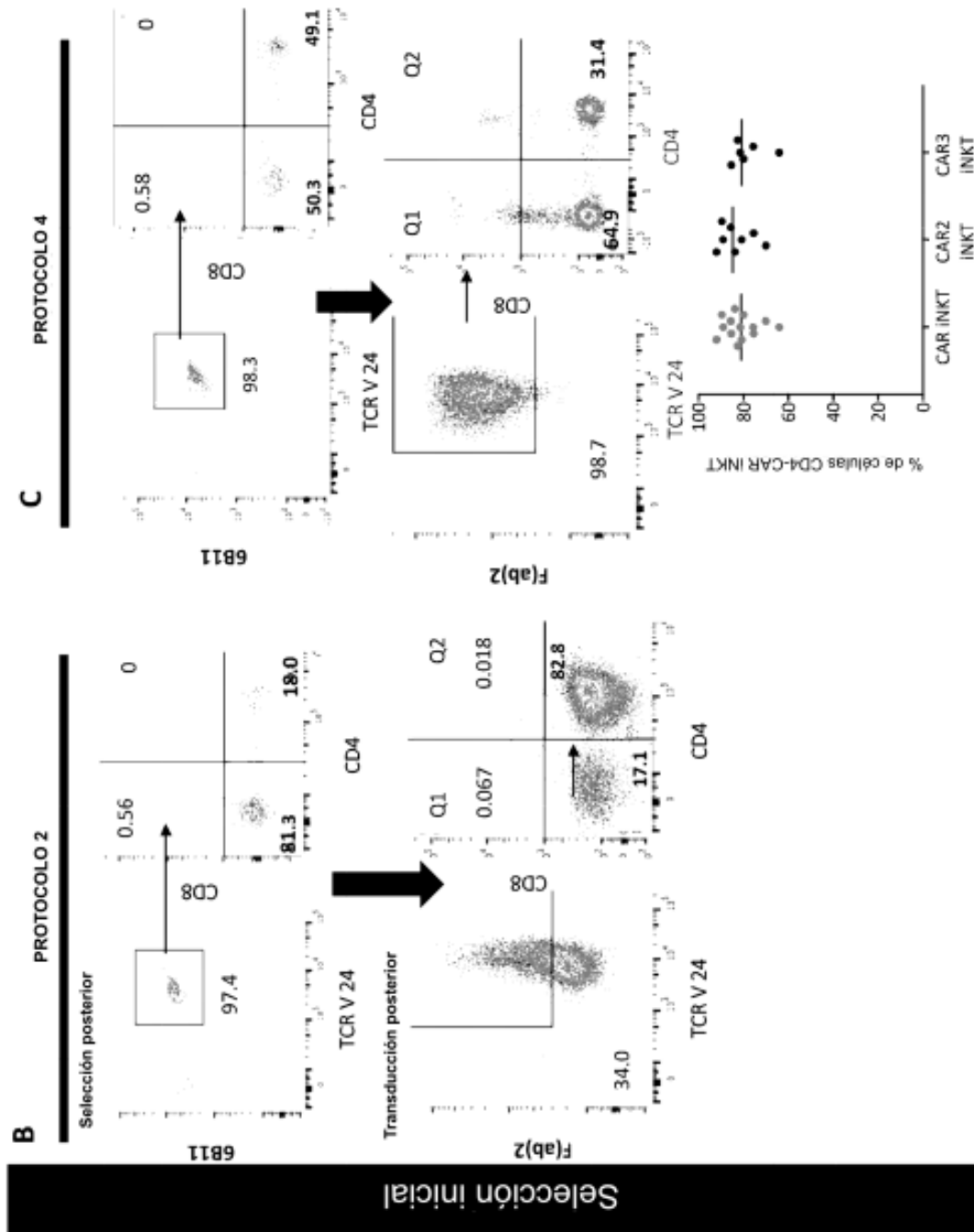


Figura 2
continuación

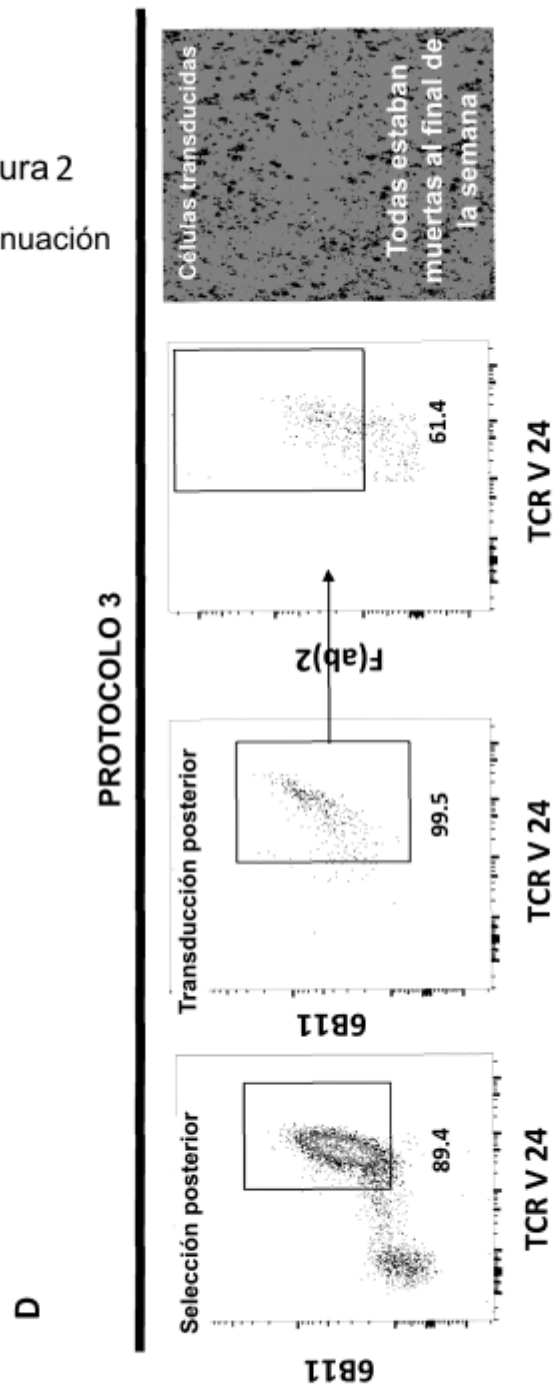
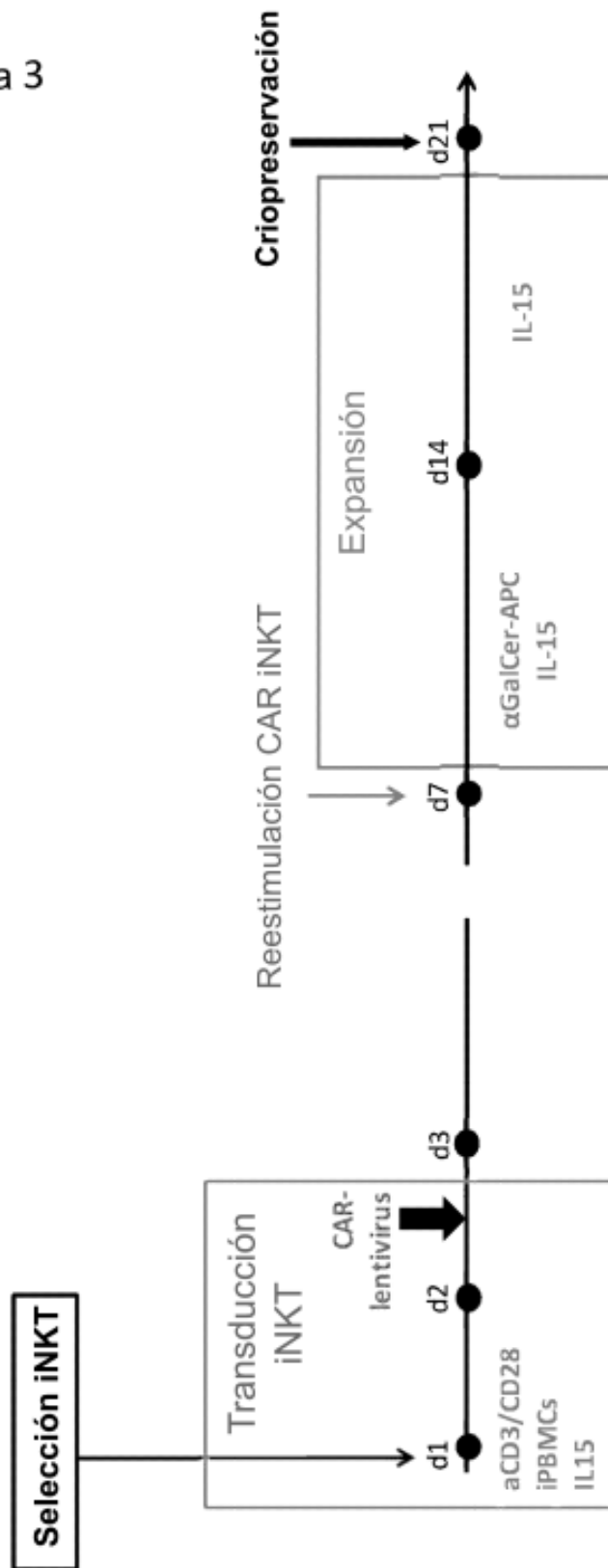


Figura 3



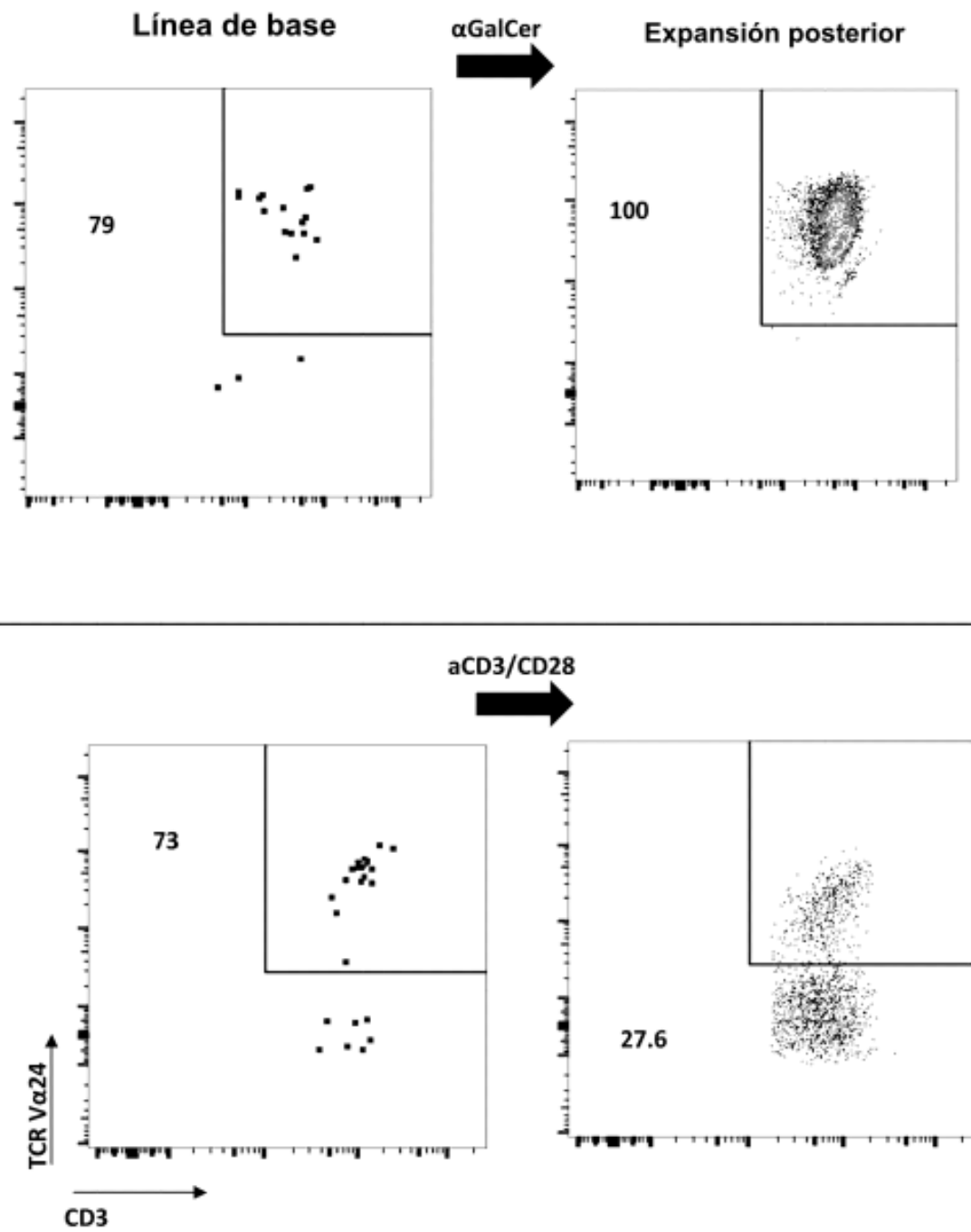


Figura 4

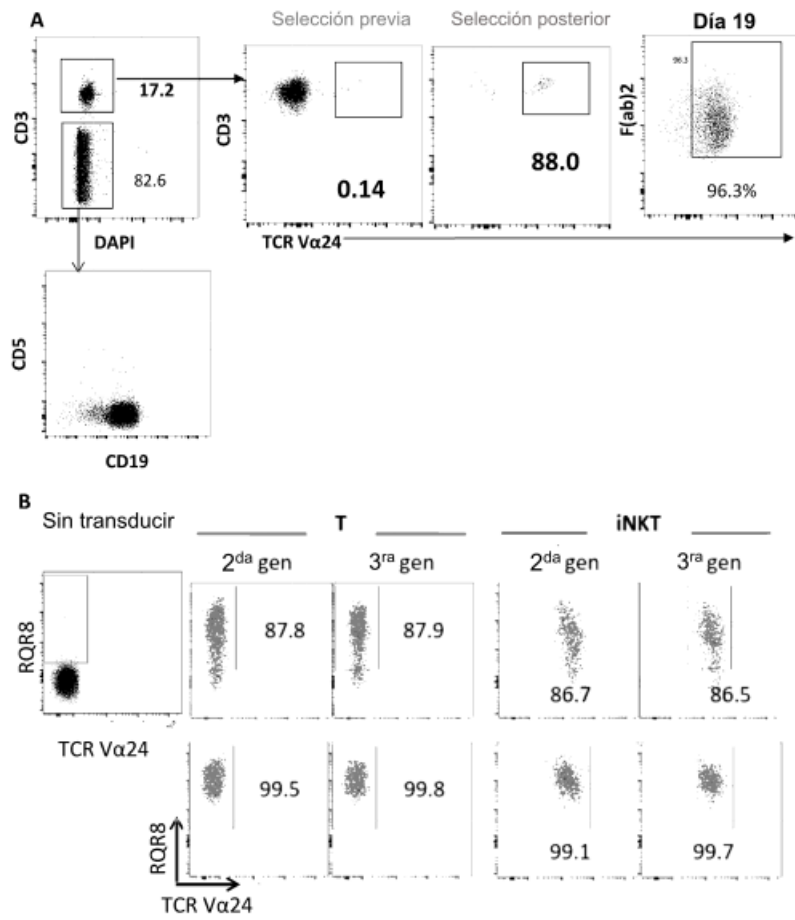


Figura 5

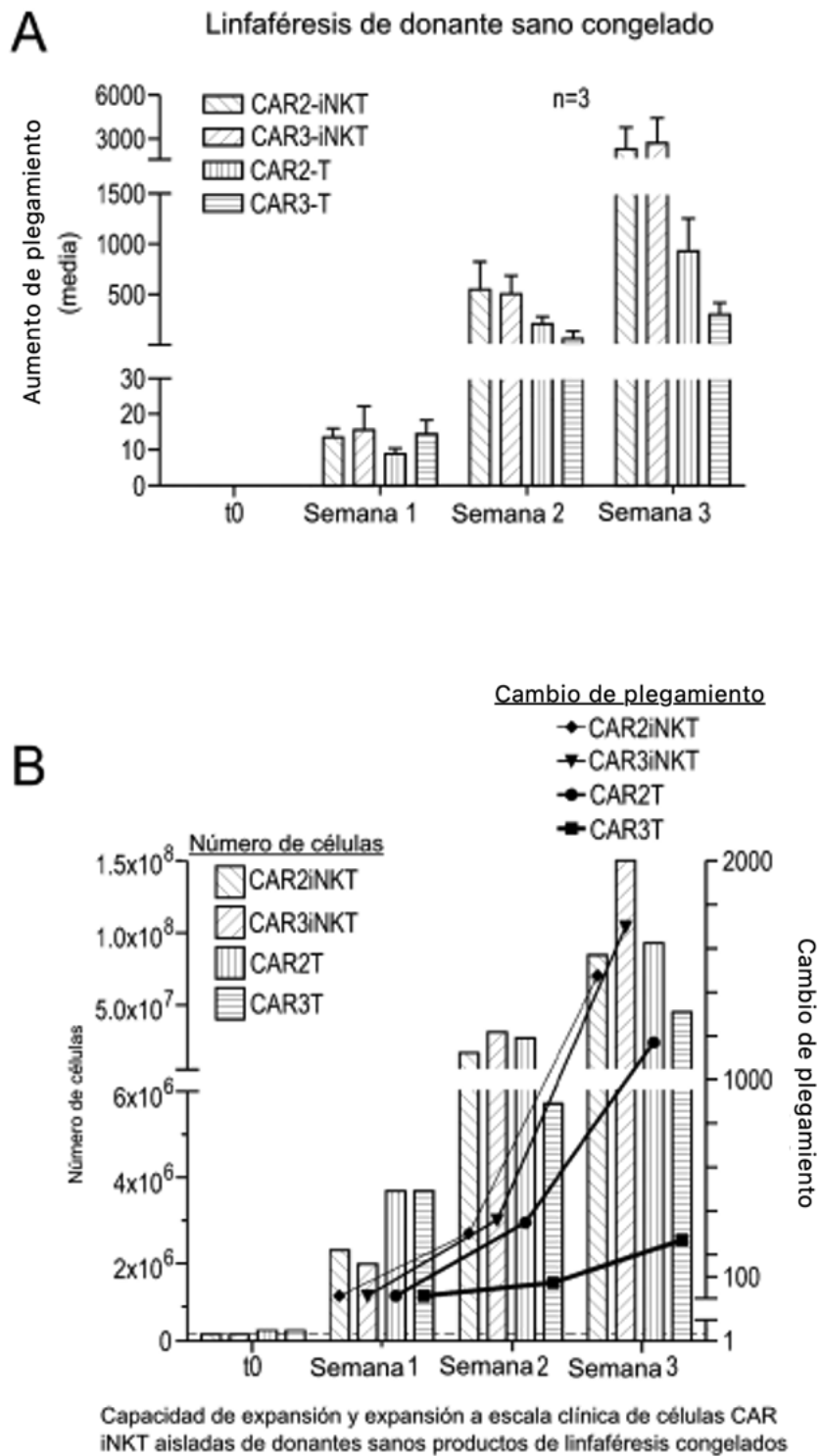
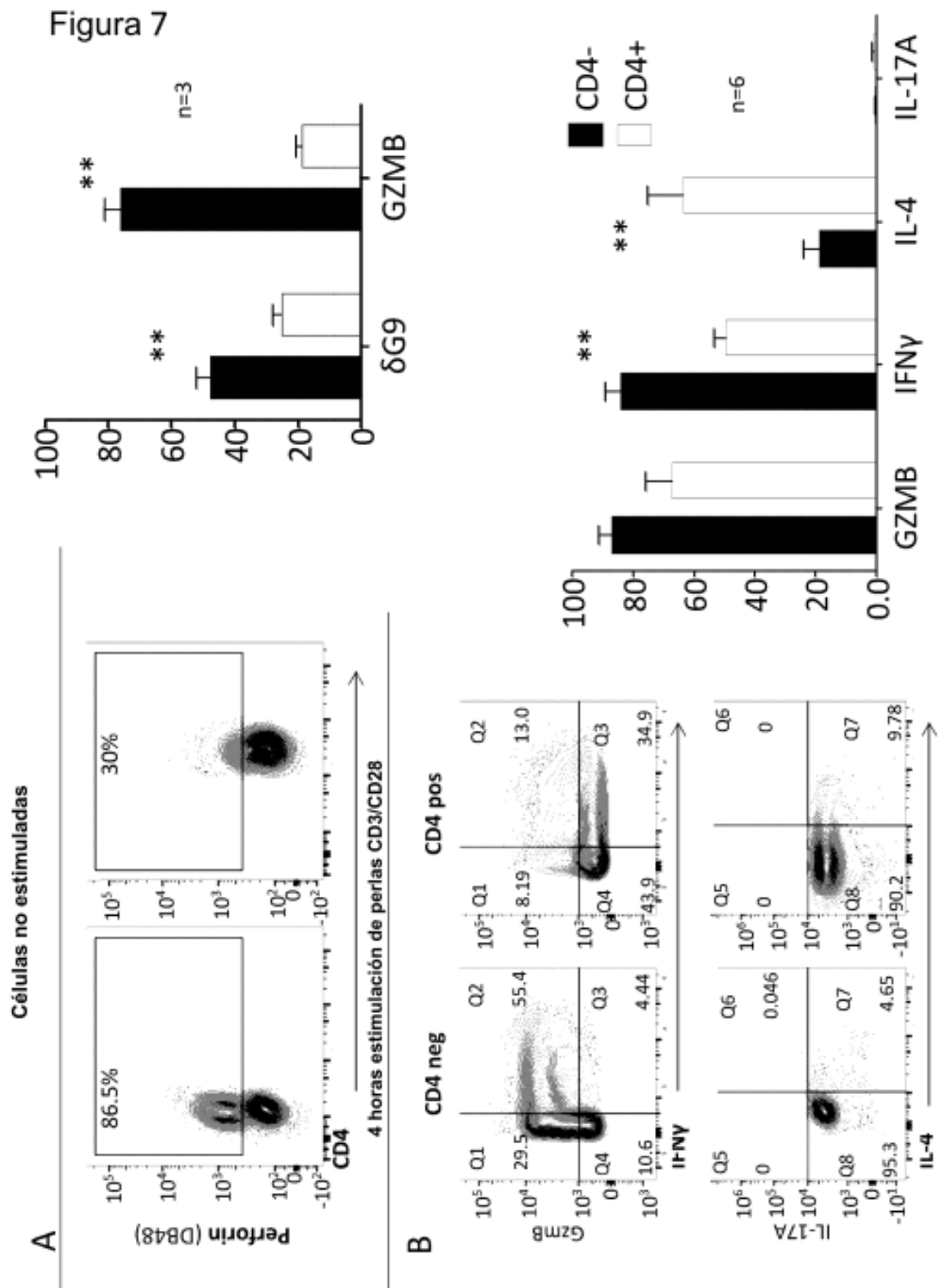


Fig. 6



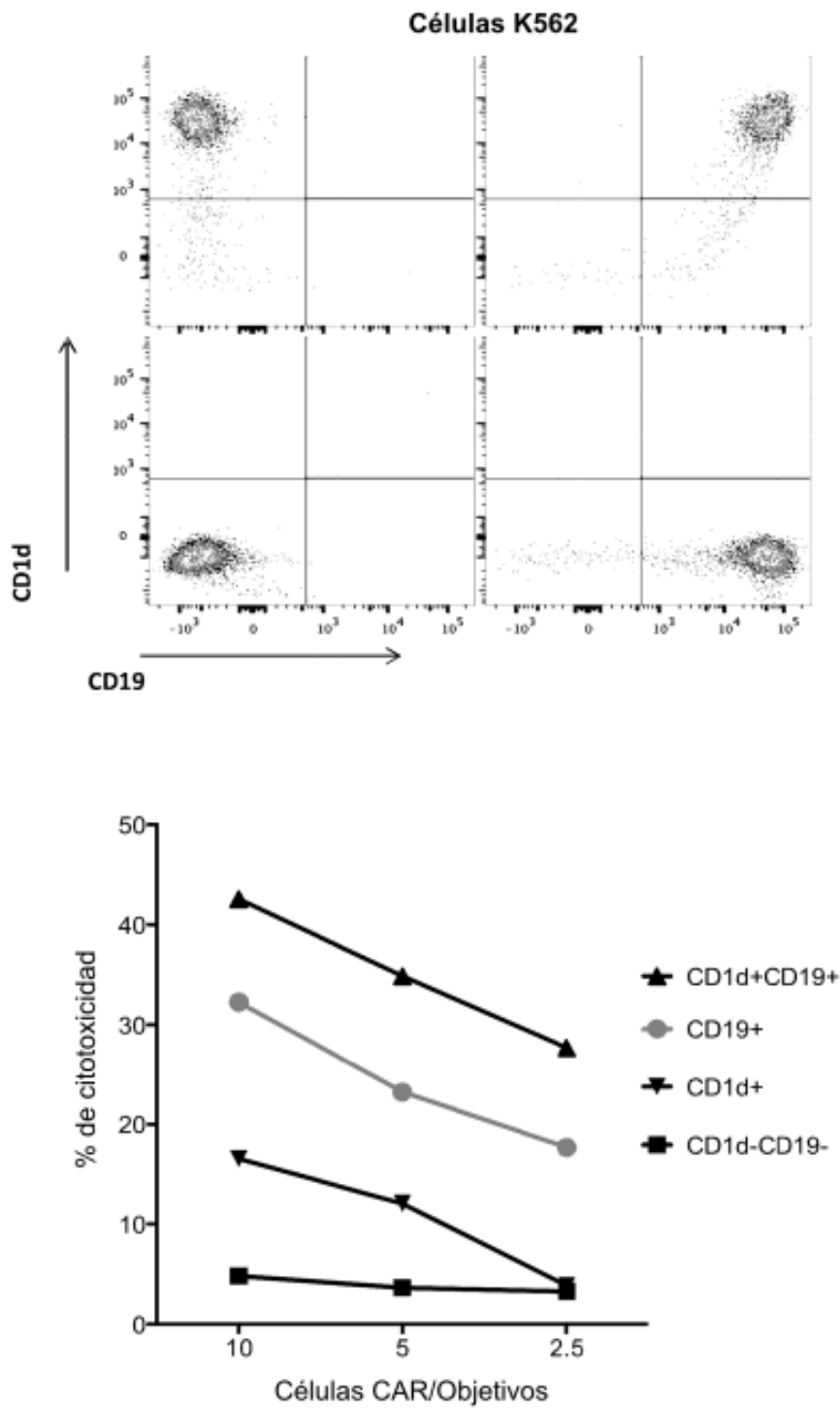


Figura 8

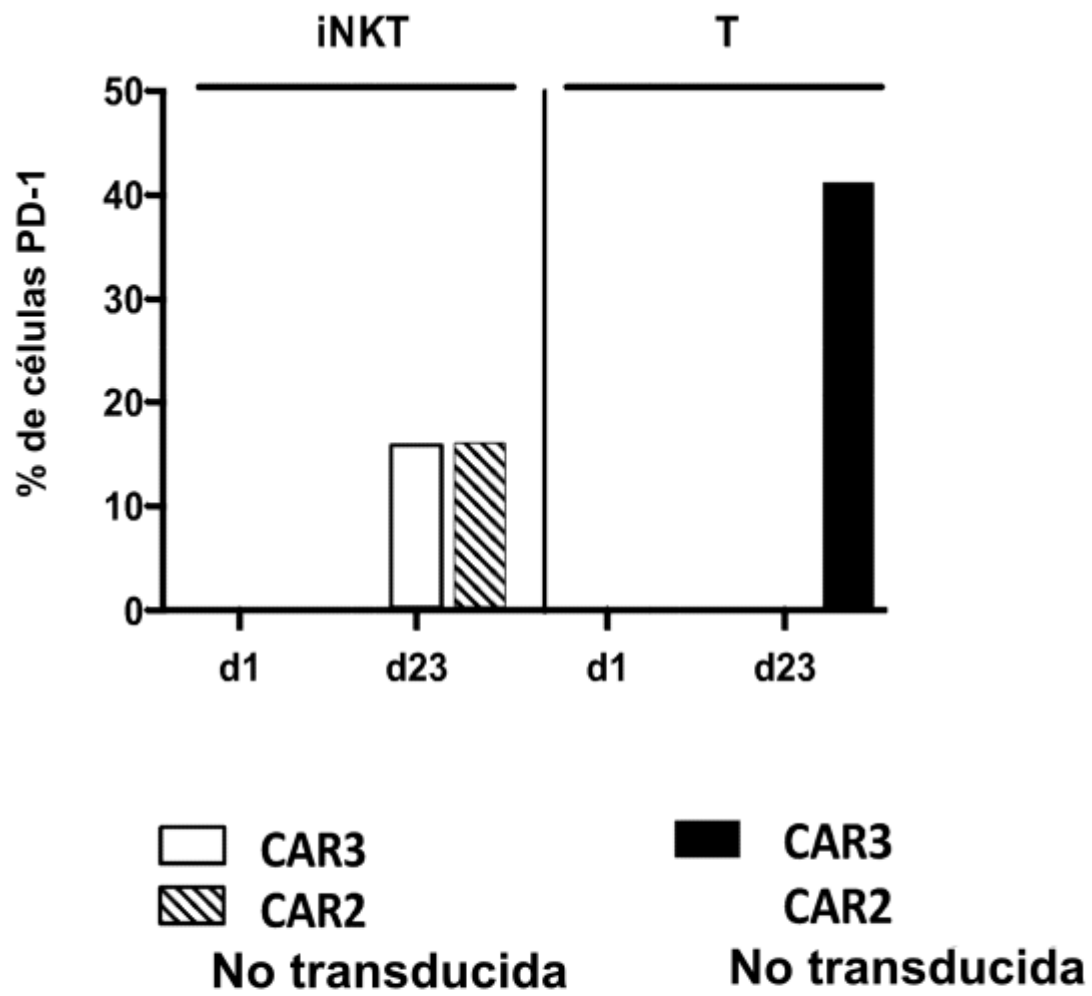


Figura 9

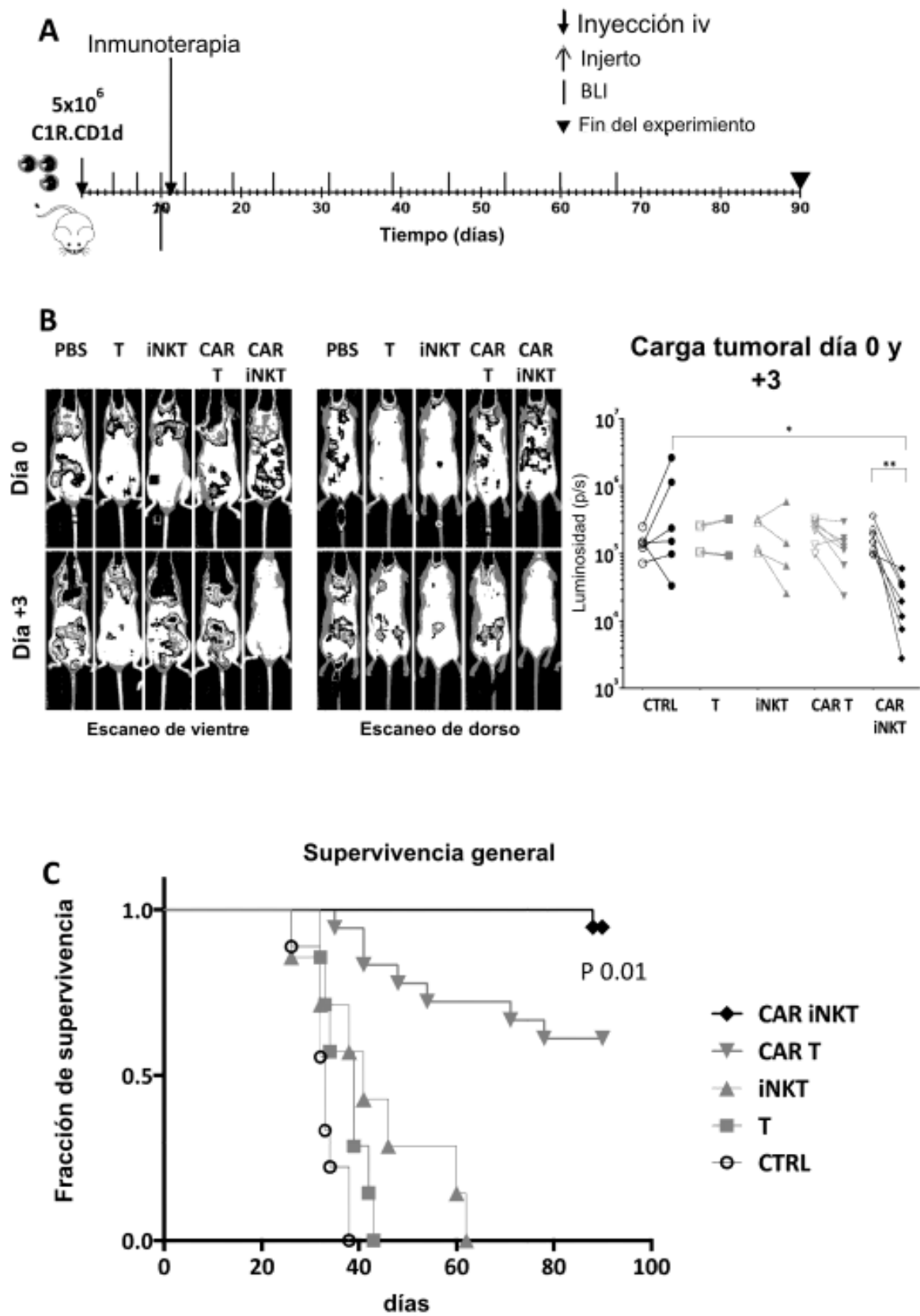


Figura 10

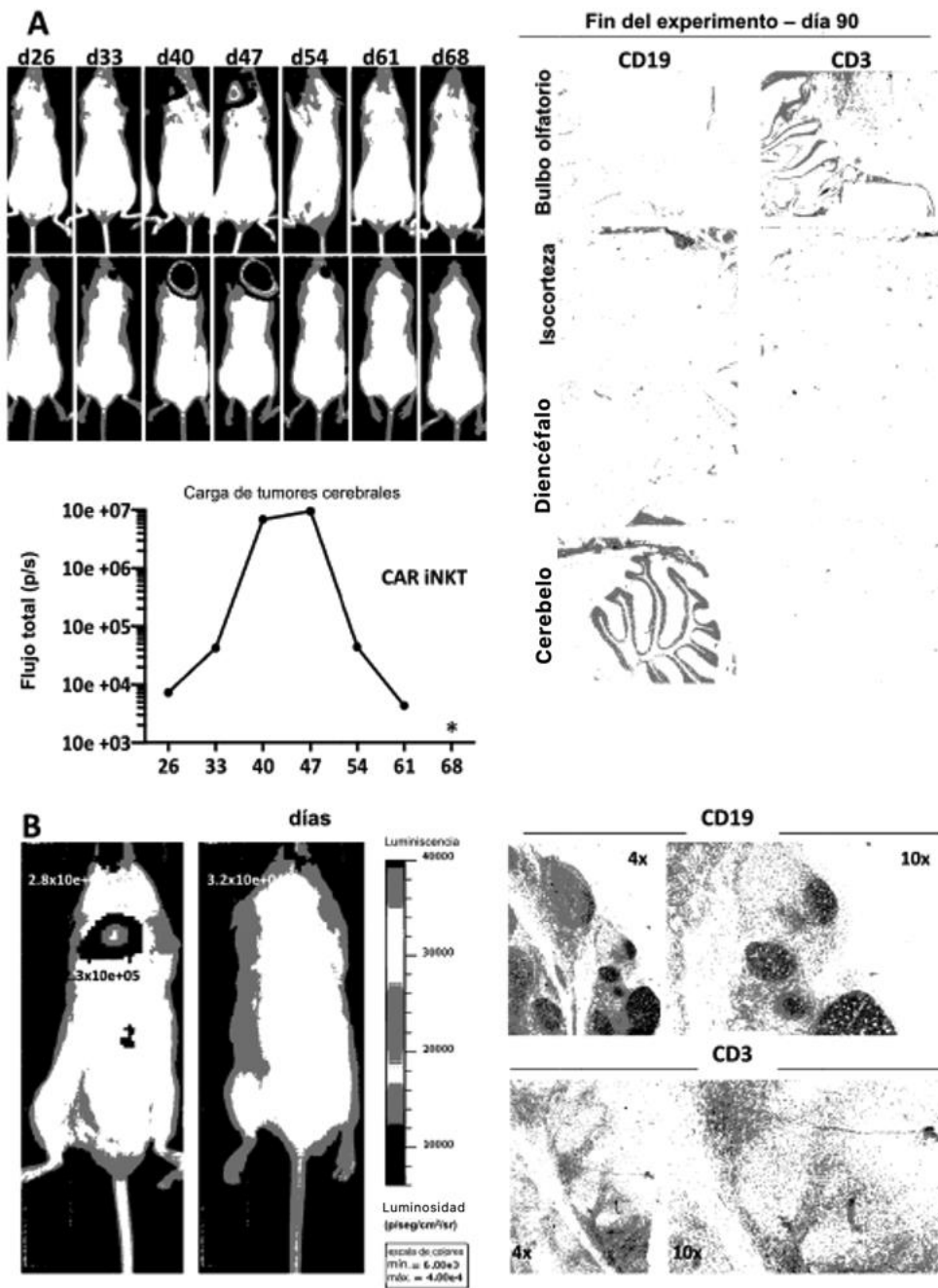


Figura 11

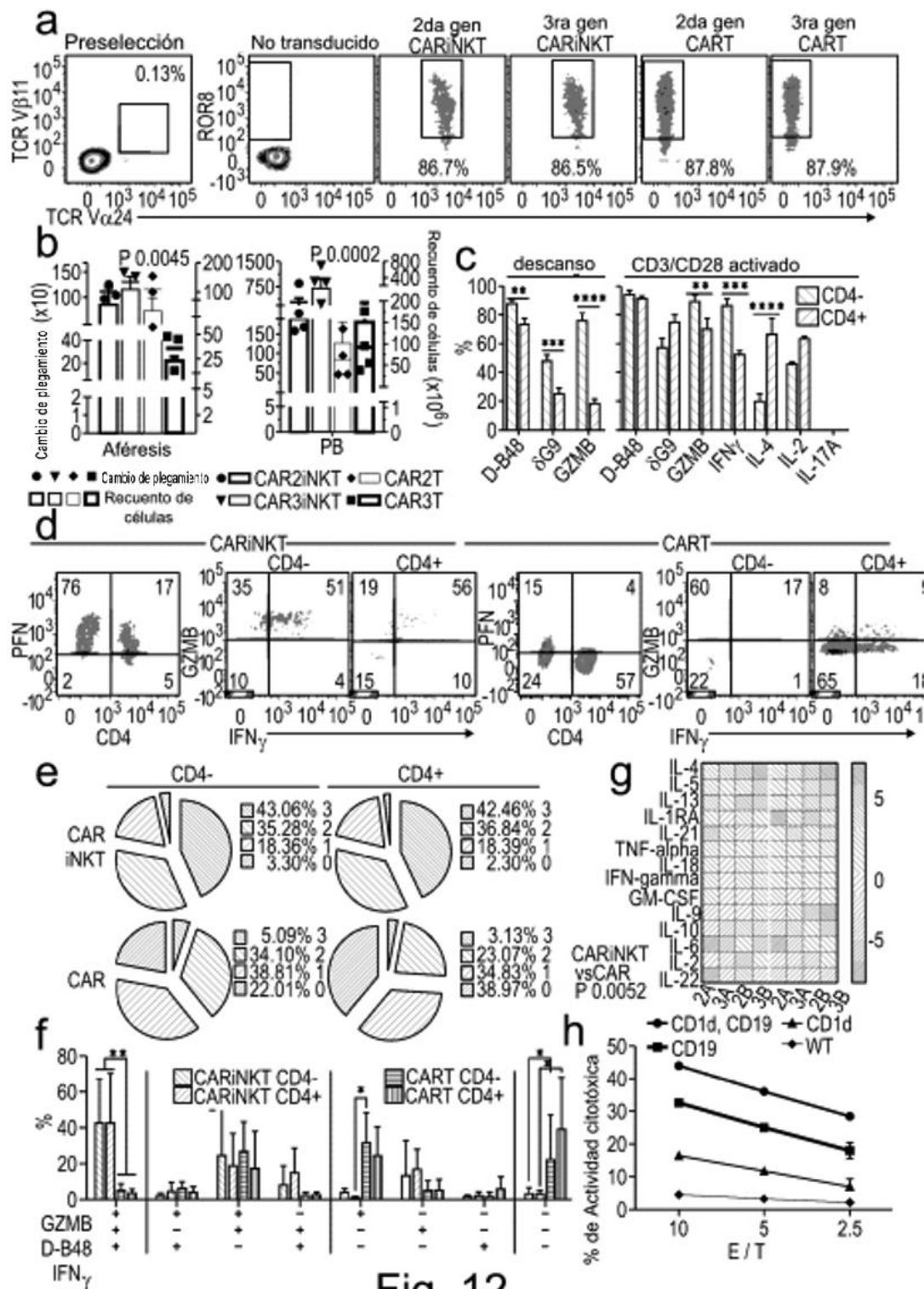


Fig. 12

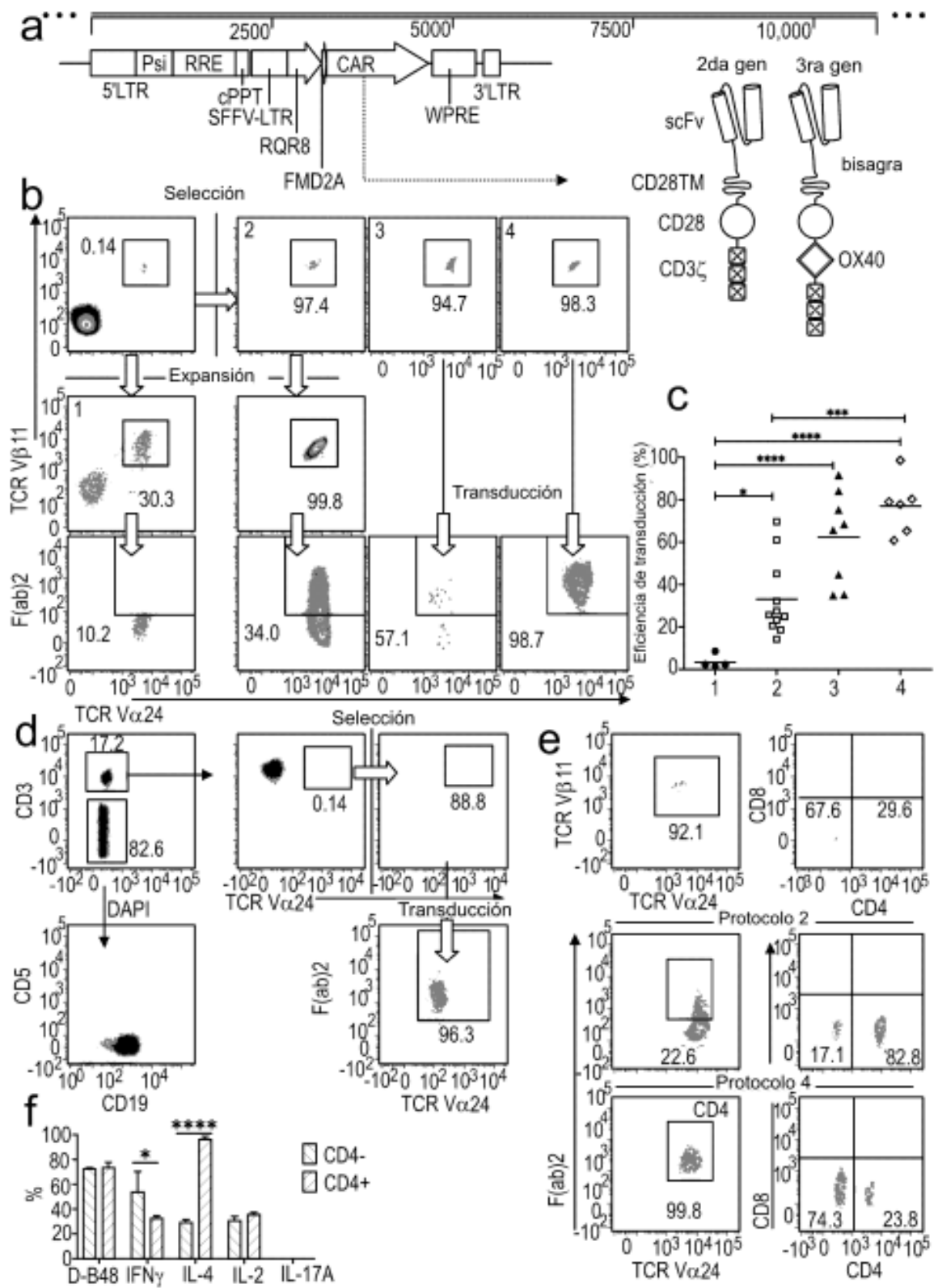
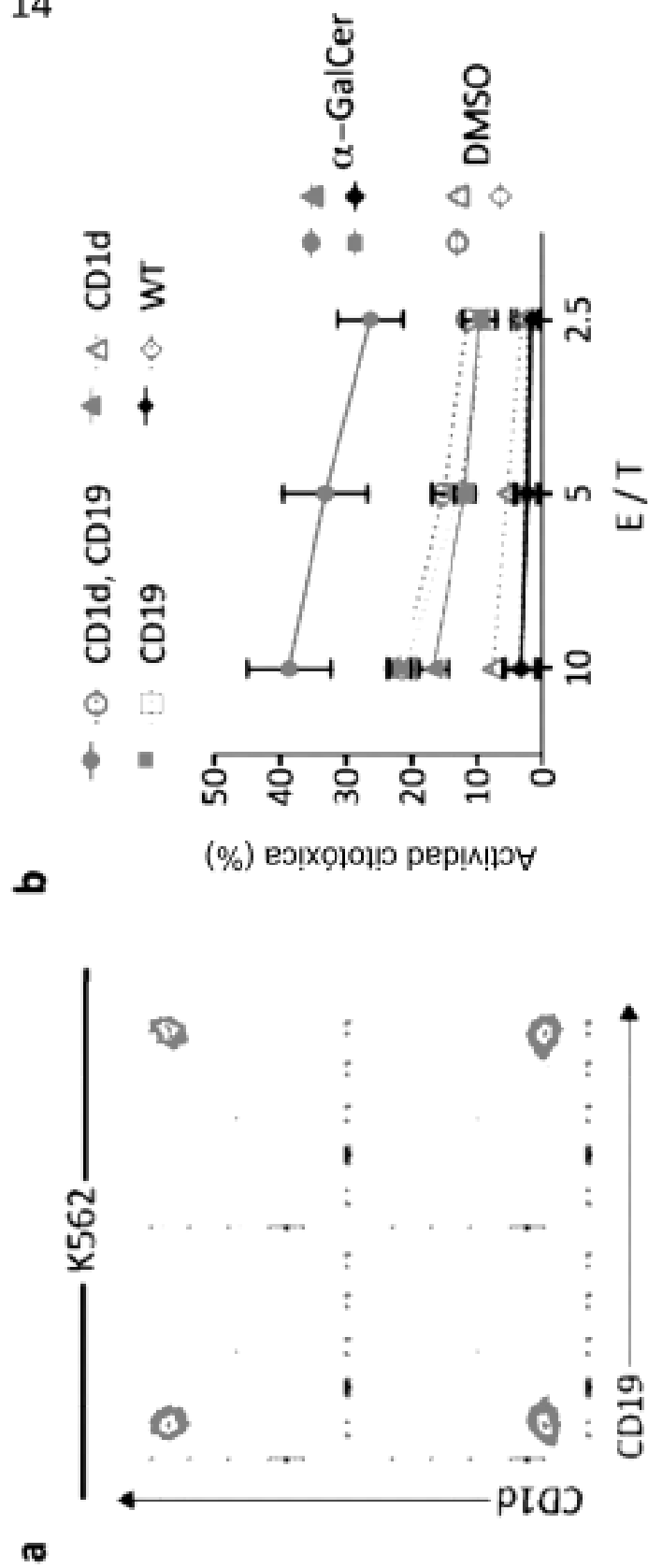


Fig. 13

Figura 14



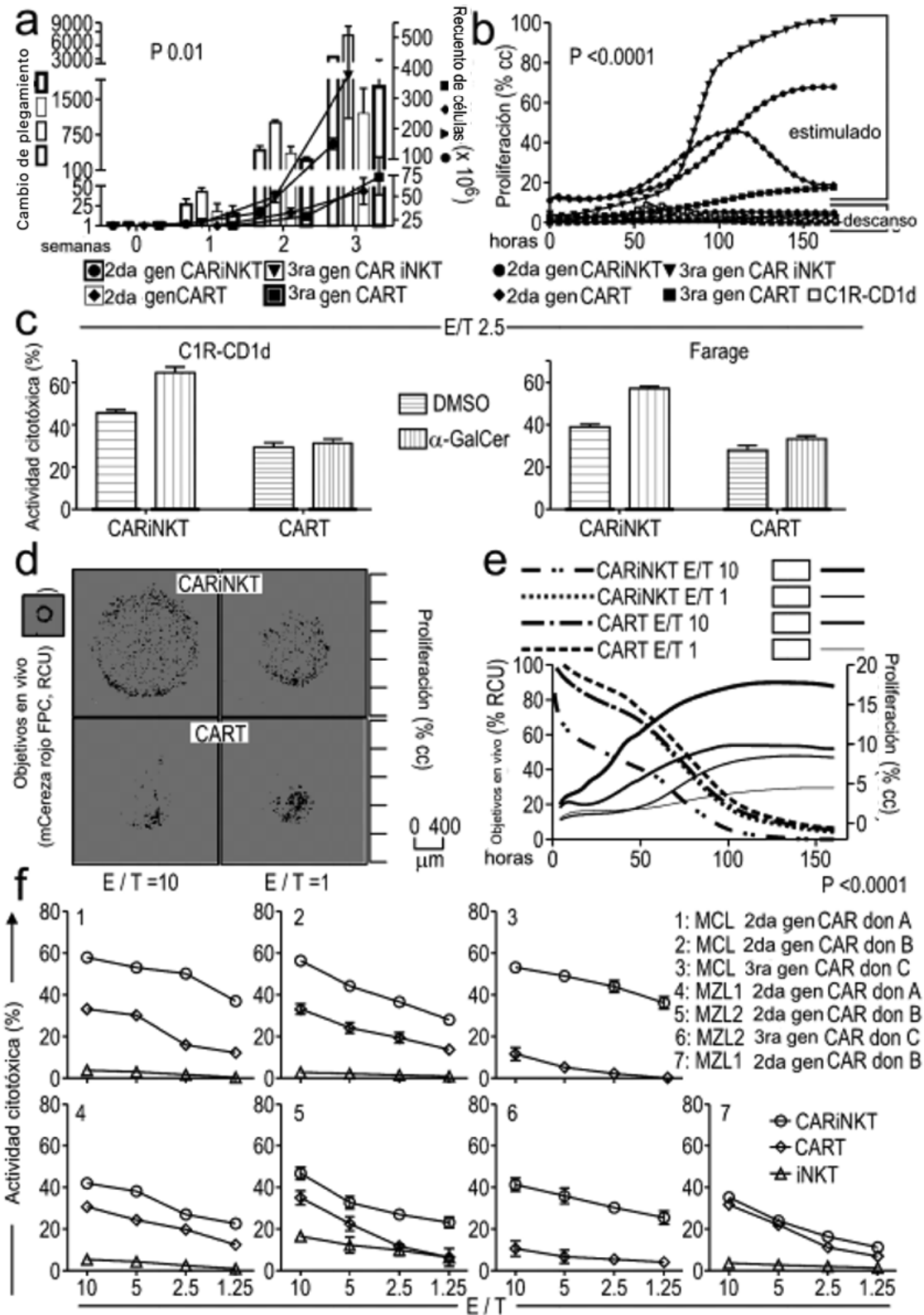


Fig. 15

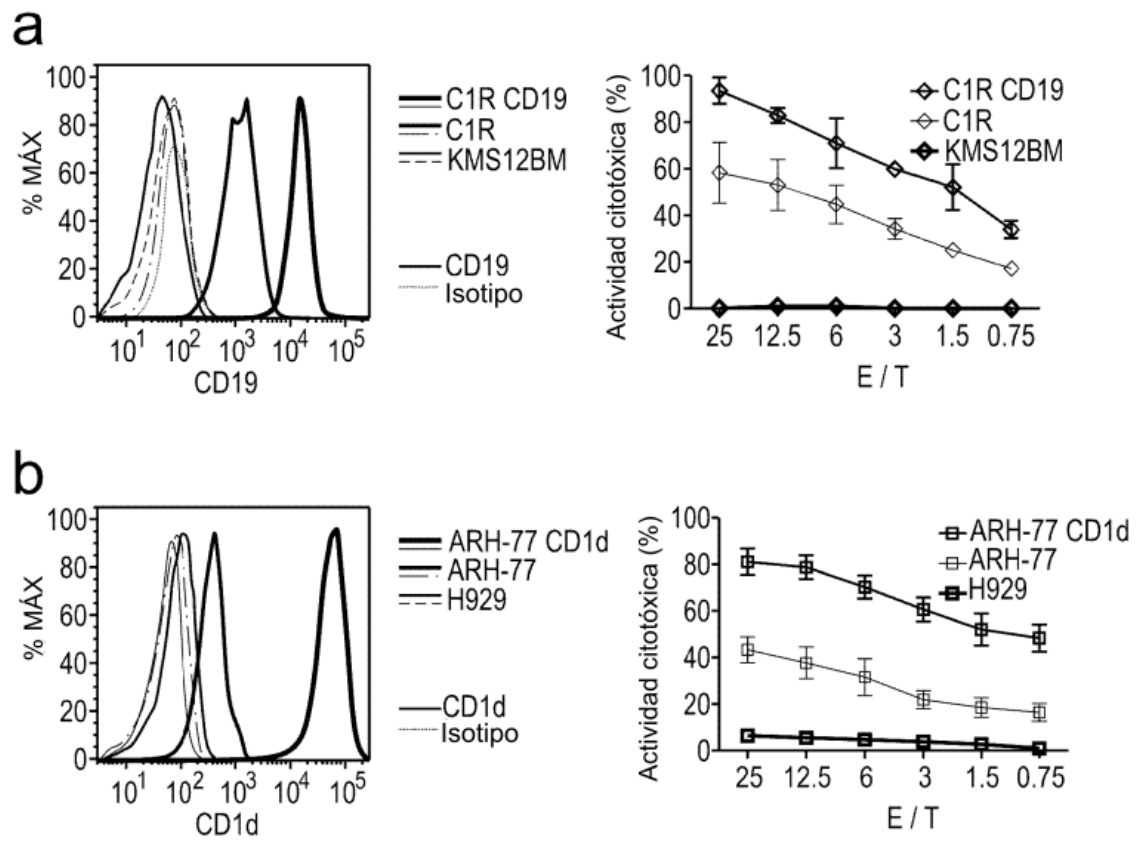


Fig. 16

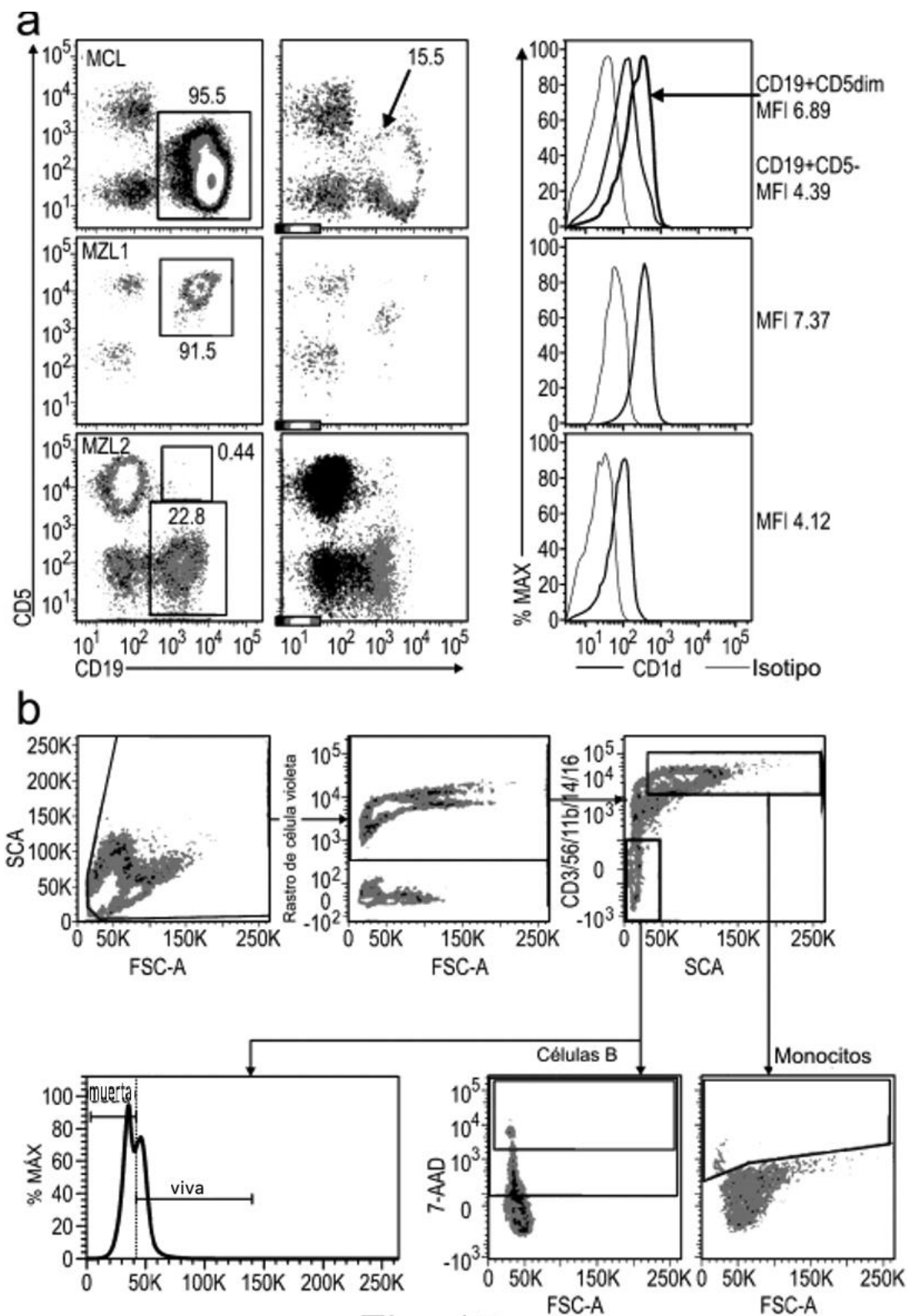
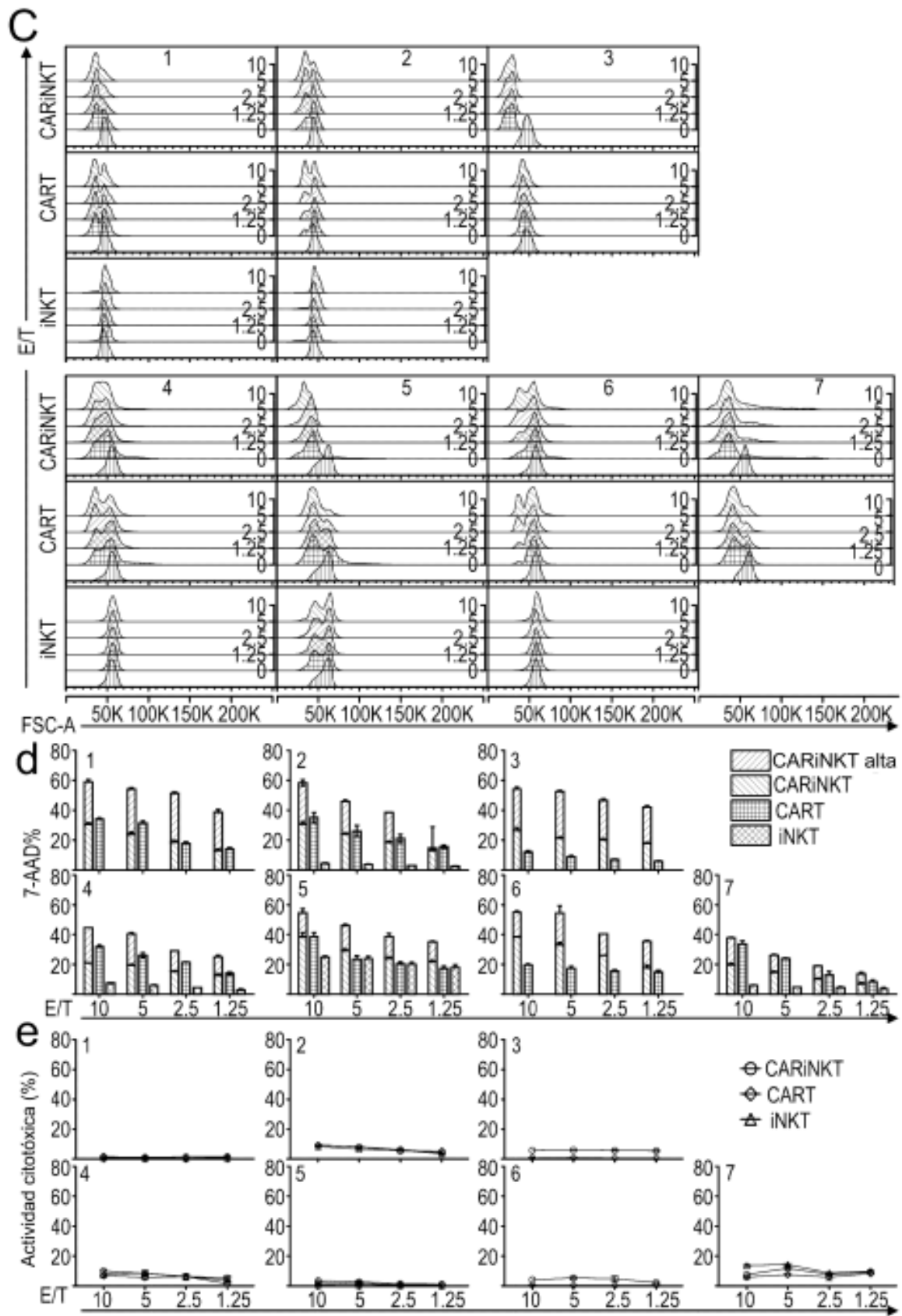


Fig. 17a



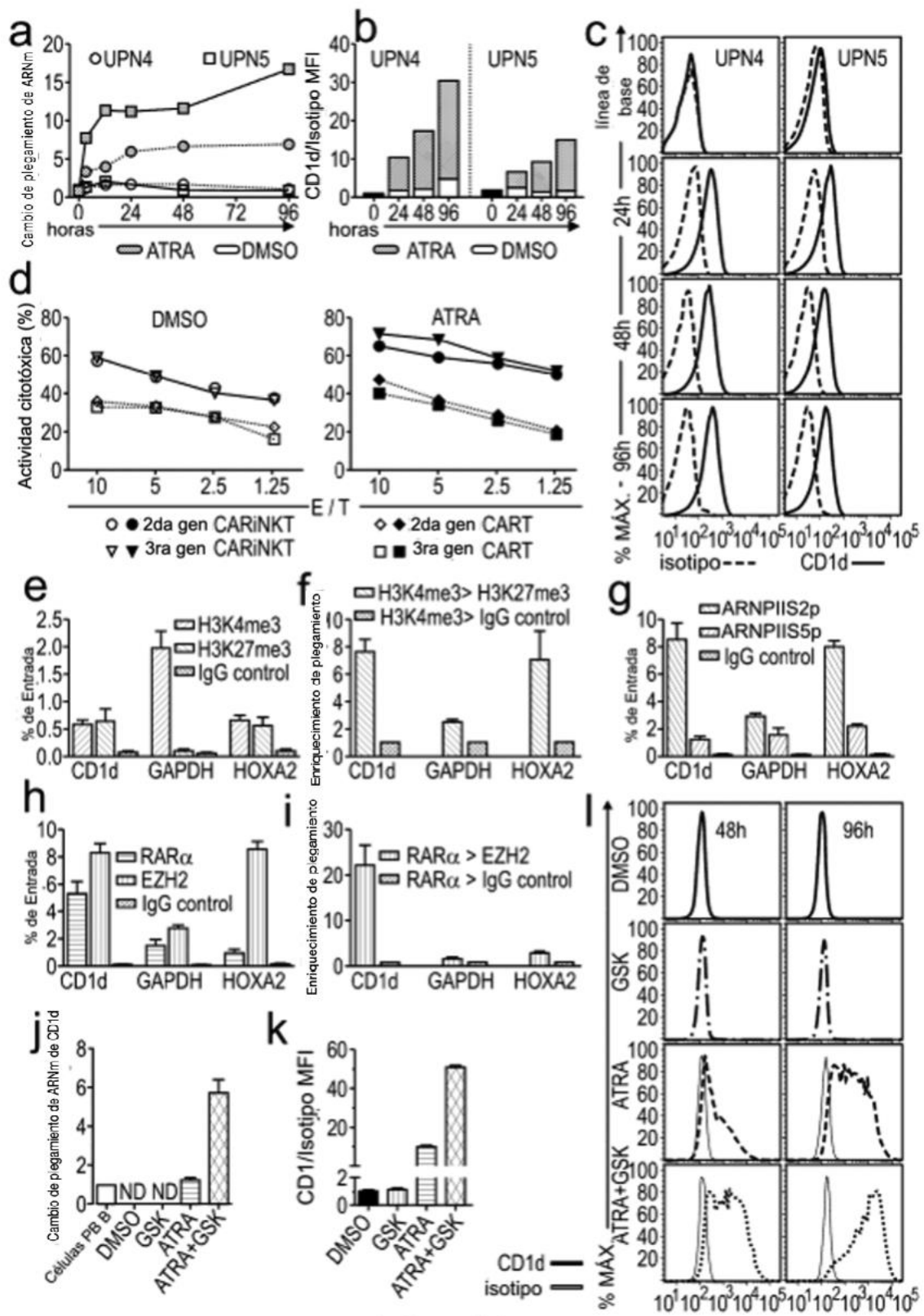


Fig. 18

65

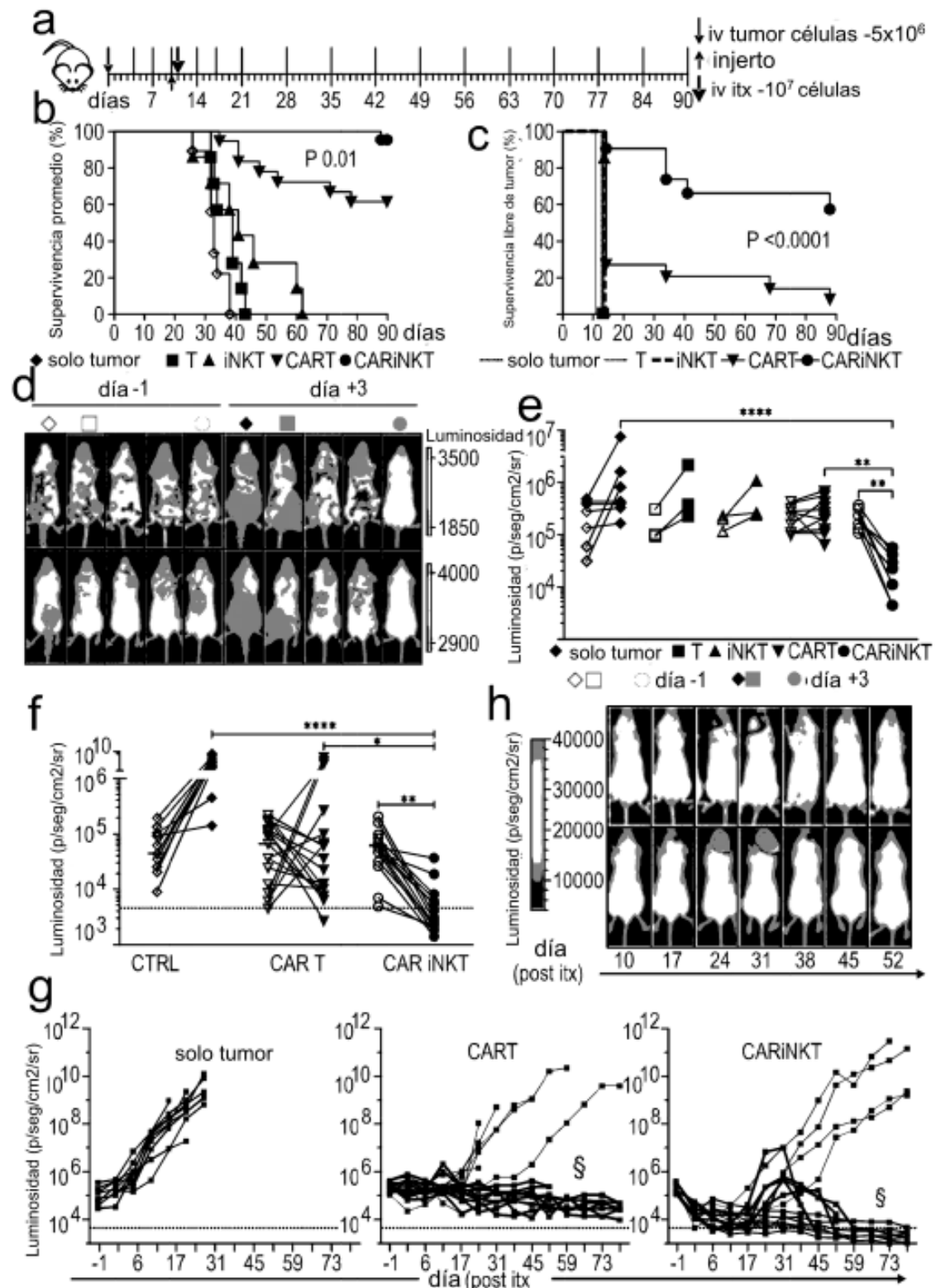
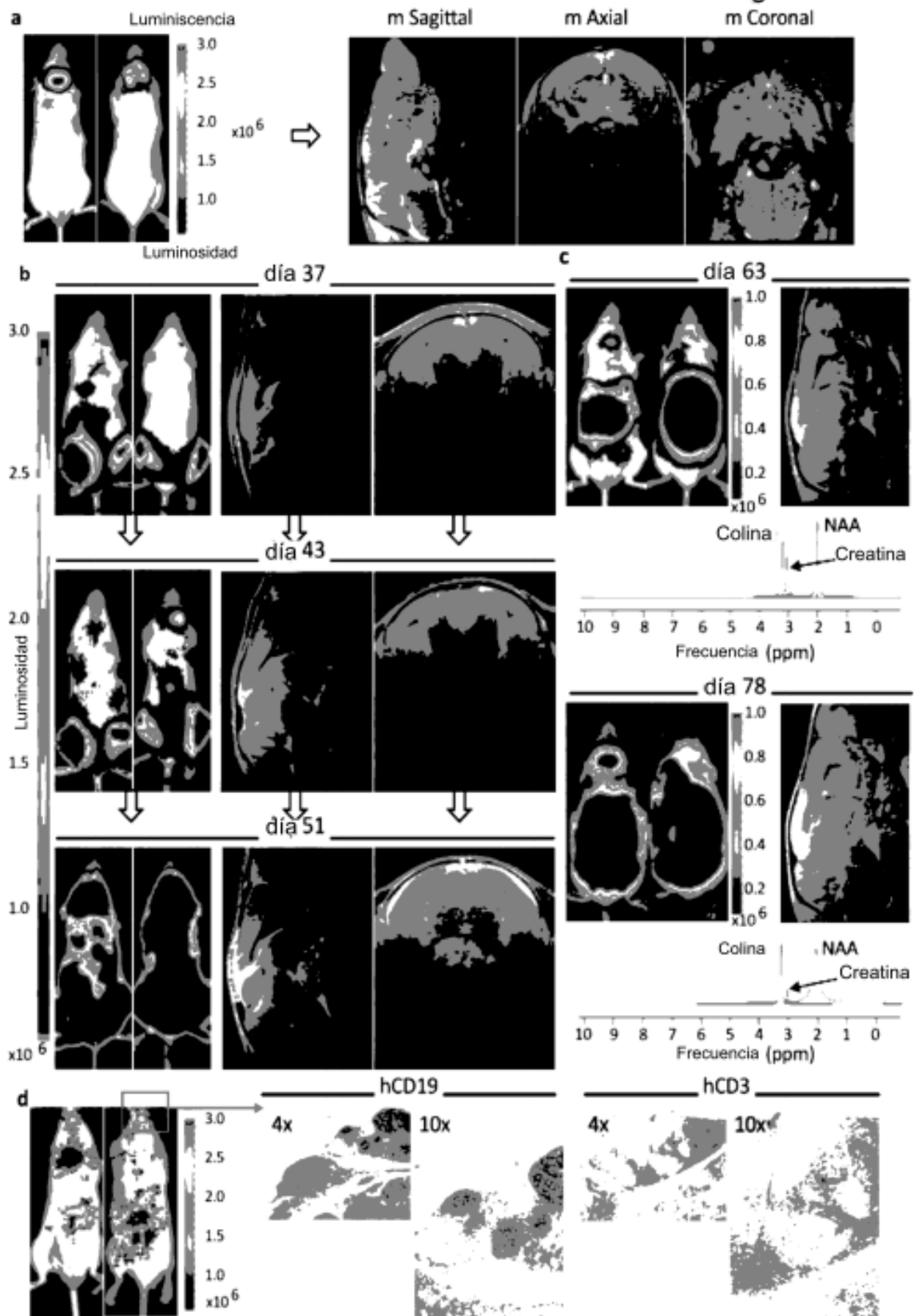


Fig. 20

Figura 21



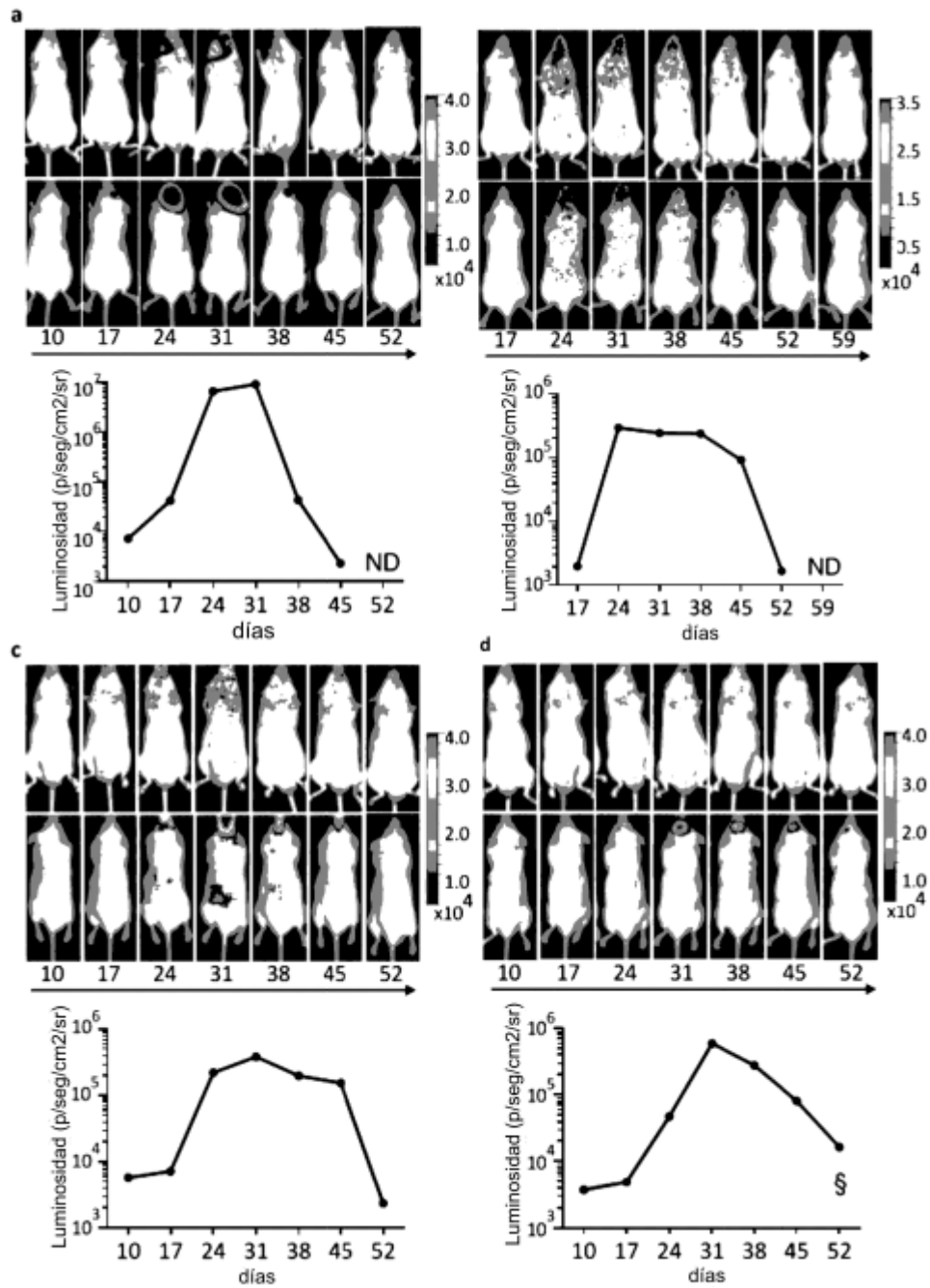


Figura 22