

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 000 510**

(51) Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C12N 5/07 (2010.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2018 PCT/US2018/031197**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2018 WO18226336**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2018 E 18813224 (5)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024 EP 3634584**

(54) Título: **Células T que se infiltran en tumores para el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

09.06.2017 US 201762517612 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2025

(73) Titular/es:

**PROVIDENCE HEALTH & SERVICES - OREGON (50.00%)
4805 NE Glisan St., Suite 2N
Portland, OR 97213, US y
AGONOX, INC. (50.00%)**

(72) Inventor/es:

**WEINBERG, ANDREW, D.;
MONTLER, RYAN;
DUHEN, THOMAS y
DUHEN, REBEKKA**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 3 000 510 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células T que se infiltran en tumores para el tratamiento del cáncer

CAMPO

5 Esto se refiere al campo del cáncer, específicamente al uso de la transferencia adoptiva de células, tales como células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺, y al uso de receptores de células T (TCR), tales como de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺, para el tratamiento de tumores, y se refiere a procedimientos para evaluar el tratamiento, tales como mediante la medición de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

ANTECEDENTES

10 El sistema inmunitario desempeña un papel importante en el reconocimiento y la destrucción de células tumorales y los nuevos enfoques terapéuticos se han centrado en impulsar y/o restaurar su función en pacientes con cáncer. Una respuesta inmunitaria eficaz implica la acción concertada de varios tipos de células diferentes, entre las cuales las células T CD8 son actores clave que pueden reconocer y destruir específicamente las células cancerosas a través de la liberación de moléculas citotóxicas y citocinas (Klebanoff CA et al., 211:214-24, Immunol. Rev., 2006). Células T CD8 infiltrantes de tumores reconocen antígenos asociados a tumores (TAA), que pueden comprender autoantígenos que se sobreexpresan en lesiones neoplásicas, así como antígenos específicos de tumores (TSA) o neoantígenos, que surgen como consecuencia de mutaciones específicas de tumores (Finn OJ, Cancer Immunol Res, 2017). Según el paradigma actual, las células T CD8 específicas de tumores se ceban en los ganglios linfáticos que drenan el tumor y a continuación migran a través de la sangre al tumor para ejercer su función efectora. Trabajos anteriores han demostrado que las células T CD8 infiltrantes de tumores representan una población heterogénea de células compuestas por células T específicas de tumores, así como células T presenciales sin especificidad tumoral. Estas últimas son reclutadas al sitio del tumor por la inflamación asociada con la progresión del tumor (proliferación, angiogénesis y metástasis). Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de procedimientos inmunoterapéuticos, donde se aumente la eficacia/eficiencia de la transferencia adoptiva.

25 Webb et al, Clin. Can. Res., 20, 2013, 434-444 describe que las células T CD103⁺CD8⁺ están asociadas con la supervivencia al cáncer de ovario.

Djenidi et al., J. Immunol., 2015, 194, 3475-3486 describe que las células T CD103⁺CD8⁺ están asociadas con la supervivencia al cáncer de pulmón.

Duhen et al, J. Immuno Therapy of Cancer, 2016, 4 (Suppl 1): 82 describe un subconjunto de células T CD8⁺ humanas residentes en tumores, marcadas por la expresión dual de CD103 y CD39.

COMPENDIO

30 Se evaluó el fenotipo y la función de las células T CD8 reactivas con tumores y se determinó que la coexpresión de CD 103 y CD39 identificó una población de células T CD8 infiltrantes de tumores inducidos específicamente en el microentorno tumoral. Estas células, que se estimulan crónicamente dentro del tumor, estaban muy enriquecidas en cuanto a la reactividad tumoral y tenían la capacidad de destruir células tumorales autólogas. Una mayor frecuencia de células T CD8+CD39+CD103+ en tumores humanos se correlacionó con una mayor supervivencia general. Se determinó que la presencia de células T CD8+CD39+CD103+ puede indicar que un procedimiento terapéutico es eficaz para tratar un tumor. Además, las células T CD8+CD39+CD103+ se pueden transferir de forma adoptiva a un sujeto para tratar un tumor.

40 La presente descripción proporciona células T autólogas CD8⁺CD39⁺CD103⁺ derivadas de un tumor para su uso en el tratamiento de un tumor autólogo en un sujeto, donde las células T autólogas CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se administran al sujeto antes, después o simultáneamente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de muerte programada (PD)-1 un antagonista de ligando de muerte programada (PD-L1), un antagonista de proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), un antagonista atenuador de linfocitos B y T (BTLA), un antagonista de inmunoglobulina de células T que contiene el dominio de mucina 3 (TIM-3), un antagonista del gen de activación de linfocitos 3 (LAG3), o un agonista de 4-1BB.

45 La presente descripción también proporciona un inhibidor de puntos de control para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto, donde se ha indicado que el sujeto responde a la inhibición de puntos de control detectando un aumento en la cantidad de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ en una muestra tumoral del sujeto en comparación con un control.

50 La presente descripción también proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto con un tumor responderá a un inhibidor de puntos de control, que comprende:

determinar la cantidad de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ en una muestra tumoral del sujeto, donde al sujeto se le ha administrado una primera dosis del inhibidor de puntos de control, donde un aumento en la cantidad de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ en la muestra biológica en comparación con un control indica que la primera dosis del inhibidor

de puntos de control es eficaz para tratar el tumor en el sujeto.

Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de la invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que se describe a continuación con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A-1F. Células T CD103+CD8 infiltrantes de tumor coexpresan la ectonucleotidasa CD39. (A) Estrategia de activación representativa para el análisis de citometría de flujo de células T que se infiltran en un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC - *head and neck squamous cell carcinoma*). Los números en las gráficas indican el porcentaje de células en las compuertas respectivas. (B) Análisis viSNE de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) cerrados en células T CD103+CD8 como se muestra en (A). La compuerta identifica las células T CD 103+ CD8 con la mayor expresión de CD39. La compuerta se aplica a todas las gráficas que muestran los niveles de expresión de PD-1, CD69 y CD127. (C) Análisis de citometría de flujo de CD8 TIL aislado de pacientes con HNSCC, melanoma, cáncer de ovario y CRLM. Los números en cada cuadrante indican el porcentaje de células positivas para CD39 y/o CD103 en células T CD3+CD8+. (D) Compendio de la frecuencia de CD39+CD103+(DP) CD8 TIL entre pacientes con diferentes neoplasias malignas sólidas. Se muestran 40 pacientes con HNSCC, 2 pacientes con cáncer de pulmón, 6 pacientes con melanoma, 2 pacientes con cáncer de ovario, 3 pacientes con cáncer rectal, 3 pacientes con cáncer de colon y 6 pacientes con CRLM. El círculo rojo resalta un paciente de colon con síndrome de Lynch, lo que lleva a la inestabilidad de los microsatélites (MSI). (E) Análisis de citometría de flujo del porcentaje de células T DP CD8 en sangre periférica, LN normal, tumor primario y LN metastásico de un paciente con HNSCC. Los números en cada cuadrante indican el porcentaje de células positivas para CD39 y/o CD103 en células T CD3+CD8+. Los datos son representativos de 40 pacientes con HNSCC analizados (solo 9 pacientes para LN normal y Met LN). Los porcentajes se resumen en (F).

Figuras 2A-2D. Perfil de expresión génica de CD8+ CD39+CD103+ TIL revela un perfil que recuerda a las células T_{RM}. (A) Análisis de componentes principales (PC A) de la expresión génica de DN, SP y DP CD8 TIL clasificados aislados de 3 pacientes con HNSCC y 2 pacientes con cáncer de ovario. El análisis se realizó en genes expresados diferencialmente entre CD8 doble positivo (DP) y doble negativo (DN) TIL (n=372). (B) Agrupación no supervisada de muestras utilizando los 372 genes expresados diferencialmente entre DP y DN CD8 TIL. El color gris oscuro indica genes regulados negativamente, el gris claro indica genes regulados positivamente. (C) Gráfico de cascada que representa el cambio en veces (log2) de los genes más regulados al alza y a la baja en los subconjuntos de DP frente a DN. El gris claro identifica genes con una firma de activación crónica; el gris oscuro indica genes asociados con el fenotipo T_{RM}. (D) Expresión de los principales genes expresados diferencialmente en cada uno de los 5 pacientes analizados. La fila superior muestra genes asociados con el fenotipo T_{RM}, la fila inferior indica genes de firma de activación crónica. Cada símbolo representa un paciente, que están conectados con líneas.

Figuras 3A-3E. Propiedades fenotípicas y funcionales de DP, SP y DN CD8 TIL. (A) Análisis fenotípico ex vivo de la expresión de proteínas de superficie CD69, CCR7, CD127 y CD28, que delinean un fenotipo T_{RM}, en CD8 TIL (superior). Resumen de la frecuencia de los marcadores mencionados anteriormente entre varios pacientes con cáncer (n=6-13, parte inferior). *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001 (ANOVA). (B) Análisis fenotípico ex vivo de la expresión de las proteínas de superficie e intracelulares PD-1, CTLA-4, TIM-3, 4-1BB y Ki-67, que delinea un fenotipo activado/crónicamente estimulado, en CD8 TIL (parte superior). Resumen de la frecuencia de los marcadores mencionados anteriormente entre varios pacientes con cáncer (n=5-17, parte inferior). ***p<0,001; ****p<0,0001 (ANOVA). (C) Análisis de citometría de flujo representativo de IFN-γ y producción de TNF-α por subconjuntos CD8 TIL estimulados durante 4 horas con PMA/Ionomicina. Los números en cada cuadrante indican el porcentaje de células positivas para IFN-γ y/o TNF-α en células T CD3+CD8+. (D) Frecuencia de células doble positivas para IFN-γ, TNF-α, IFN-γ/TNF-α por subconjuntos CD8 TIL. Los datos son de 6 pacientes con HNSCC. (E) Análisis citométrico de flujo representativo de la producción de granzima B por CD8 TIL (izquierda) y resumen de 6 pacientes diferentes con HNSCC (derecha). *p<0,05; **p<0,01 (ANOVA).

Figura 4. Expresión de CD39 y CD103 en células T CD8 requiere estimulación sostenida en un medio rico en TGF-β. Cinética de la expresión de CD39, CD103 y PD-1 en células T CD8 vírgenes clasificadas de sangre periférica. Células se estimularon con perlas recubiertas con CD3/CD28 en una perla: La relación de células T de 1:2 en presencia o ausencia de TGF-β (2ng/ml) y la expresión de CD39, CD103 y PD-1 se analizó mediante citometría de flujo en los puntos de tiempo indicados. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes.

Figuras 5A-5D. DP CD8 TIL son altamente clonales y comparten poca superposición con cualquier otro subconjunto de células T CD8. (A) Diversidad del repertorio de TCRβ dentro de las células T CD8 de memoria sanguínea, DN, SP y DP CD8 TIL. Las frecuencias del clonotipo más frecuente, del 2° al 5° más frecuente, del 6° al 30° más frecuente y el resto de los clonotipos se muestran para pacientes con HPV+ y HPV- HNSCC y una paciente con cáncer de ovario. (B) Los 500 clonotipos CD8 TIL más frecuentes se grafican según su frecuencia en subconjuntos DN, SP y DP CD8 TIL. Cada punto representa un clonotipo de TCR distinto. Los puntos en el eje indican los clonotipos detectados dentro de un único repertorio. (C) El mismo análisis que en (B) comparando la frecuencia de los 500 clonotipos principales en las células T CD8 de memoria en sangre y LN normal con la frecuencia de los 500 clonotipos principales en los subconjuntos CD8 TIL de DN y DP. (D) Superposición de secuencia TCRβ analizada utilizando el índice Morisita-Horn entre el DP CD8 TIL y las células T CD8 de memoria sanguínea, DN CD8 TIL y SP CD8 TIL. Una

superposición de secuencia de TCR β de 1 indica 100 % de similitud entre dos poblaciones.

Figuras 6A-6F. DP CD8 TIL reconoce y destruye las células tumorales autólogas y su frecuencia se correlaciona con una mejor supervivencia general. (A) Se evaluó la reactividad tumoral de CD8 TIL expandido cultivándolos durante 20 h con un número creciente de células tumorales autólogas, y el reconocimiento se evaluó midiendo la frecuencia de la expresión de 4-1BB (símbolos llenos) y la secreción de IFN- γ (símbolos abiertos). Los resultados se muestran para tres pacientes con cáncer. (B) La reactividad de DP CD8 TIL se confirmó mediante cultivo con células tumorales autólogas con o sin anticuerpo bloqueante de MHC-I, células tumorales alogénicas y anti-CD3 unido a placa. Se muestra la regulación positiva de 4-1BB después de 20 horas para tres pacientes con cáncer. (C) La destrucción de células tumorales se midió evaluando la cantidad de eventos de caspasa 3/7+/pocillo monitoreados cada hora durante un período de 20 horas. (D) Imágenes representativas de DN y DP CD8 tomadas al principio (T=0) y al final del cocultivo (T=20 horas). (E) Supervivencia general en una cohorte de 62 pacientes con HNSCC basada en la frecuencia de DP CD8 TIL entre el total de CD8 TIL en el momento de la cirugía. (F) Análisis similar realizado en una cohorte de 30 pacientes con HNSCC negativos para VPH.

Figuras 7A-7C. DP CD8 TIL están Enriquecidos en células reactivas tumorales y el repertorio de TCR del tumor primario se superpone con el repertorio de TCR de LN metastásico dentro del mismo individuo. (A) y (B) DP CD8 TIL se clasificaron y expandieron in vitro. Después de la expansión, DP CD8 TIL se cocultivó con células tumorales autólogas durante 24 h. Al final del cultivo, las células se clasificaron según su expresión de 4-1BB y CD25. El repertorio de TCR de DP CD8 TIL antes del cocultivo se comparó con el repertorio de TCR de 4-1BB+CD25+ DP CD8 TIL (reactivo al tumor). Los 15 clonotipos principales en el DP CD8 TIL antes del cocultivo están presentes con sus respectivas frecuencias antes y después del cocultivo con células tumorales. Se indican los resultados de dos pacientes con cáncer. (C) Los 500 clonotipos DP CD8 TIL más frecuentes se grafican según su frecuencia en el tumor primario y el LN metastásico. Se indican los resultados de dos pacientes con HNSCC. Las SEQ ID NO: 1-15 se muestran en la Figura 7A, en orden de arriba (SEQ ID NO:1) a abajo (SEQ ID NO: 15). Las SEQ ID NO: 16-30 se muestran en la Figura 7B, en orden de arriba (SEQ ID NO: 16) a abajo (SEQ ID NO: 30).

LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos y código de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada. El Listado de secuencias se envía como un archivo de texto ASCII [Listado de secuencias, 4 de mayo de 2018, 7.113 bytes]. En el listado de secuencias adjunto:

Las SEQ ID NO: 1-30 son las secuencias de nucleótidos de regiones CDR3 de TCRB ejemplares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Existe la necesidad de mejorar la eficacia de la inmunoterapia y la transferencia adoptiva de células T para pacientes con cáncer, y la necesidad de caracterizar las células T CD8 involucradas en la respuesta antitumoral, con el fin de utilizar una subpoblación particular para los procedimientos de diagnóstico. Células T CD39 $^{+}$ CD8 $^{+}$ incluyen células T CD39+CD103+CD8+ y células T CD39+ CD103-CD8+. Se describe en esta invención que se determinó el fenotipo y la función de las células T CD8 reactivas a tumores, y se documentó que la coexpresión de CD103 y CD39 identificó una población única de células T CD8 infiltrantes de tumores inducidas específicamente en el microentorno tumoral. Estas células, que se estimulan crónicamente dentro de un tumor, están altamente enriquecidas para la reactividad tumoral y tienen la capacidad de destruir células tumorales autólogas. Una mayor frecuencia de células T CD103+CD39+CD8 en tumores humanos se correlacionó con una mayor supervivencia general, lo que indica que la evaluación de estas células en muestras biológicas proporciona procedimientos para determinar la eficacia del tratamiento y para evaluar si un sujeto con un tumor responderá al tratamiento.

Términos

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan según el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

4-1BB: Una proteína transmembrana, también denominada CD137 y TNFRSF9, que es una proteína de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRS). La expresión de 4-1BB en general depende de la activación y está presente en un amplio subconjunto de células inmunitarias que incluyen células NK y NKT activadas, células T reguladoras, células T CD4 y CD8 activadas, células dendríticas (DC), mastocitos estimulados, células mieloides en diferenciación, monocitos, neutrófilos y eosinófilos (Wang, 2009, *Immunological Reviews* 229: 192-215). También se

ha demostrado la expresión de 4-1BB en la vasculatura tumoral (Broil, 2001, Amer. J. Clin. Pathol. 115(4):543-549; Seaman, 2007, Cancer Cell 11: 539-554) y en sitios de endotelio inflamado o aterosclerótico (Drenkard, 2007 FASEB J. 21: 456-463; Olofsson, 2008, Circulation 117: 1292-1301). El ligando que estimula 4-1BB, es decir, el ligando 4-1BB (4-1BBL), se expresa en células presentadoras de antígenos activadas (CPA), células progenitoras mieloides y células madre hematopoyéticas. 4-1BB humano es una proteína de 255 aminoácidos (véanse los números de acceso de GENBANK NM-001561 y NP 001552. Anticuerpos agonistas de 4-1BB se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. N.º 8,337,850.

Nivel de alteración: Cambiar, ya sea aumentando o disminuyendo, el número de células de un tipo celular específico, o el nivel de producción o expresión de una secuencia de ácido nucleico o secuencia de amino ácido (por ejemplo, un polipéptido, un ARNip, un ARNm, un ARNm, un gen), en comparación con un nivel de control.

Antisentido, sentido y antígeno: El ADN tiene dos cadenas antiparalelas, una cadena 5' → 3', denominada cadena positiva, y una cadena 3' → 5', denominada cadena negativa. Debido a que la ARN polimerasa añade ácidos nucleicos en una dirección 5' → 3', la cadena menos del ADN sirve como plantilla para el ARN durante la transcripción. Por lo tanto, un transcripto de ARN tendrá una secuencia complementaria a la cadena negativa e idéntica a la cadena positiva (excepto que U sustituye a T).

Moléculas antisentido son moléculas que son específicamente hibridables o específicamente complementarias a ARN o a la cadena positiva de ADN. Moléculas sentido son moléculas que son específicamente hibridables o específicamente complementarias a la cadena negativa de ADN. Moléculas de antígenos son moléculas antisentido o sentido dirigidas a una diana de ADN. Un ARN antisentido (ARNas) es una molécula de ARN complementaria a una molécula de ácido nucleico sentido (codificante).

Anticuerpo: Un ligando polipeptídico que comprende al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce y se une (tal como reconoce específicamente y se une específicamente) a un epítopo de un antígeno, tal como un polipéptido PD-1, PD-L1, CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3 o 4-1BB, o un fragmento del mismo. Moléculas de inmunoglobulina se componen de una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominada región pesada variable (V_H) y región ligera variable (V_L). En conjunto, la región V_H y la región V_L son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo.

Anticuerpos incluyen inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de anticuerpos bien conocidos en la técnica, tales como anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos de dominio V_H), fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)², proteínas Fv de cadena única ("scFv") y proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"). Una proteína scFv es una proteína de fusión donde una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un enlazador, mientras que, en los dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas modificadas genéticamente tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como, anticuerpos biespecíficos). Véase también, *Pierce Catalog and Handbook*, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., *Immunology*, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Típicamente, una inmunoglobulina de origen natural tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se conocen como "dominios"). En combinación, las regiones variables de cadena pesada y ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de cadena ligera y pesada contienen una región de "estructura" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". La extensión de la región de estructura y las CDR se ha definido según Rabat *et al.* (véase, Rabat y *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, 1991) y la base de datos ImMunoGeneTics (IMGT) (véase, Lefranc, *Nucleic Acids Res* 29:207-9, 2001; y imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg). La base de datos de Rabat se mantiene en línea (ncbi.nlm.nih.gov/igblast/). Las secuencias de las regiones de estructura de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie, tal como los seres humanos. La región de estructura de un anticuerpo, es decir, las regiones de estructura combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítopo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N, y también se identifican típicamente por la cadena donde se encuentra la CDR particular. Por lo tanto, una CDR3 de V_H (o H-CDR3) se encuentra en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo donde se encuentra, mientras que una CDR1 de V_L (o L-CDR1) es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo donde se encuentra. Un anticuerpo que se une a PD-1, PD-L1 o PD-L2, por ejemplo, tendrá una región V_H específica y la secuencia de la región V_L , y por lo tanto secuencias de CDR específicas. Anticuerpos con diferentes especificidades (*i.e.* diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de un

anticuerpo a otro, solo un número limitado de posiciones de aminoácidos dentro de las CDR están directamente involucradas en la unión al antígeno. Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos determinantes de especificidad (SDR).

Referencias a " V_H " o " VH " se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye la de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a " V_L " o " VL " se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, que incluye la de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula donde se han transfectado los genes de cadena ligera y/o pesada de un único anticuerpo. Anticuerpos monoclonales se producen mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante la fabricación de células hibridas formadoras de anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células de bazo inmunitarias. Anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Un "anticuerpo químico" tiene residuos de estructura de una especie, tal como humana, y CDR (que en general confieren unión al antígeno) de otra especie, tal como un anticuerpo murino que se une específicamente a un polipéptido PD-1, PD-L1, CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3 o 4-1BB.

Un anticuerpo "humano" (también llamado anticuerpo "completamente humano") es un anticuerpo que incluye regiones de estructura humanas y todas las CDR de una inmunoglobulina humana. En un ejemplo, la estructura y las CDR son de la misma secuencia de aminoácidos de cadena pesada y/o ligera humana de origen. Sin embargo, las estructuras de un anticuerpo humano pueden diseñarse para incluir CDR de un anticuerpo humano diferente. Una inmunoglobulina "humanizada" es una inmunoglobulina que incluye una región de estructura humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina «donante» y la inmunoglobulina humana que proporciona la estructura se denomina «aceptor». En una realización, todas las CDR son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. No es necesario que las regiones constantes estén presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, *i.e.*, al menos aproximadamente 85-90 %, tal como aproximadamente 95 % o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Un «anticuerpo humanizado» es un anticuerpo que comprende una cadena ligera humanizada y una inmunoglobulina de cadena pesada humanizada. Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDR. La estructura aceptora de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados de la estructura donante.

Anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas adicionales, que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de inmunoglobulina. Inmunoglobulinas humanizadas se pueden construir por medio de ingeniería genética (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5,585,089).

Antígeno: Un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, incluidas las composiciones que se inyectan o absorben en un animal. Un antígeno reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica, incluidos los inducidos por inmunógenos heterólogos. El término "antígeno" incluye todos los epítopos antigenicos relacionados. "Epítopo" o "determinante antigenico" se refiere a un sitio en un antígeno al que responden las células B y/o T. En una realización, las células T responden al epítopo, cuando el epítopo se presenta junto con una molécula de MHC. Epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo típicamente incluye al menos 3, y más usualmente, al menos 5, aproximadamente 9 o aproximadamente 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Procedimientos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalográfia de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional.

Célula presentadora de antígeno (APC): Una célula que puede presentar antígeno unido a moléculas MHC de clase I o de clase II a las células T. Las APC incluyen, entre otros, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células T y células de Langerhans. Una célula T que puede presentar antígeno a otras células T (incluyendo células T CD4+ y/o CD8+) es una célula T presentadora de antígeno (T-APC).

Atenuador de linfocitos B y T (BTLA): Una proteína también conocida como CD272. La expresión de BTLA se induce durante la activación de las células T, y BTLA permanece expresado en las células Th1. BTLA interactúa con un homólogo de B7, B7H4, y desempeña un papel en la inhibición de las células T a través de la interacción con los receptores de la familia de necrosis tumoral. BTLA es un ligando para la superfamilia del factor de necrosis tumoral (receptor), miembro 14 (TNFRSF14), también conocido como mediador de entrada del virus del herpes (HVEM). Los complejos BTLA-HVEM regulan negativamente las respuestas inmunitarias de las células T. Una secuencia de aminoácidos de BTLA específica, no limitante, y una secuencia de ARNm que codifica BTLA, se proporciona en

GENBANK® Accession No. NM_001085357, 1 de septiembre de 2016. Antagonistas de BTLA incluyen agentes que reducen la expresión o actividad de BTLA o inhiben la función de inhibición de células T de BTLA, por ejemplo, al unirse específicamente a BTLA e inhibir la unión de BTLA a los receptores del factor de necrosis tumoral. Ejemplos de compuestos incluyen anticuerpos (tales como un anticuerpo anti-BTLA), moléculas de ARNi, moléculas antisentido y proteínas negativas dominantes.

Unión o unión estable (oligonucleótido): Un oligonucleótido se une o se une de forma estable a un ácido nucleico diana si una cantidad suficiente del oligonucleótido forma pares de bases o se hibrida con su ácido nucleico diana, para permitir la detección de esa unión. La unión se puede detectar mediante propiedades físicas o funcionales del complejo diana: oligonucleótido. La unión entre una diana y un oligonucleótido se puede detectar mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica, que incluye ensayos de unión tanto funcionales como físicos. Por ejemplo, la unión puede detectarse funcionalmente determinando si la unión tiene un efecto observable sobre un procedimiento biosintético tal como la expresión de un gen, la replicación del ADN, la transcripción, la traducción y similares.

En la técnica se conocen bien procedimientos físicos para detectar la unión de cadenas complementarias de ADN o ARN, e incluyen procedimientos tales como ADNasa I o huella química, ensayos de escisión por desplazamiento y afinidad en gel, transferencia *Northern*, transferencia puntual y procedimientos de detección de absorción de luz. Por ejemplo, un procedimiento que se usa ampliamente, debido a que es simple y confiable, implica observar un cambio en la absorción de luz de una solución que contiene un oligonucleótido (o un análogo) y un ácido nucleico diana a 220 a 300 nm a medida que la temperatura aumenta lentamente. Si el oligonucleótido o análogo se ha unido a su diana, hay un aumento repentino en la absorción a una temperatura característica a medida que el oligonucleótido (o análogo) y la diana se disocian entre sí, o se funden.

La unión entre un oligómero y su ácido nucleico diana se caracteriza frecuentemente por la temperatura (T_m) a la que el 50 % del oligómero se funde a partir de su diana. Una mayor (T_m) significa un complejo más fuerte o más estable en relación con un menor (T_m).

Afinidad de unión: Afinidad de un anticuerpo por un antígeno. En una realización, la afinidad se calcula mediante una modificación del procedimiento de Scatchard descrito por Frankel *et al.*, *Mol. Immunol.*, 16:101-106, 1979. En otra realización, la afinidad de unión se mide mediante una tasa de disociación de antígeno/anticuerpo. En otra realización, se mide una alta afinidad de unión mediante un radioinmunoensayo de competición. En otra realización, la afinidad de unión se mide mediante ELISA. Un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno (tal como un polipéptido PD-1, PD-L1, CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3 o 4-1BB) es un anticuerpo que se une al antígeno con alta afinidad y no se une significativamente a otros antígenos no relacionados.

Terapéutico contra el cáncer: Cualquier agente de uso para tratar el cáncer en un sujeto. Agentes terapéuticos contra el cáncer incluyen un inhibidor de puntos de control, un modificador de la respuesta biológica (por ejemplo, citocinas y quimiocinas), una vacuna contra el cáncer, quimioterapia y/o radiación.

Agentes quimioterapéuticos: Cualquier agente químico con utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular anormal. Tales enfermedades incluyen tumores, neoplasias y cáncer, así como enfermedades caracterizadas por crecimiento hiperplásico tales como psoriasis.

En una realización, un agente quimioterapéutico es un compuesto radiactivo. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente un agente quimioterapéutico de uso (véase, por ejemplo, Slapak y Kufe, *Principles of Cancer Therapy*, Capítulo 86 en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14^a edición; Perry *et al.*, *Chemotherapy*, Cap. 17 en Abel off, *Clinical Oncology* 2^a ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer, L., Berkery, R. (edsf. *Oncology Pocket Guide to Chemotherapy*, 2^a ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer, D.S., Knobf, M.F., Durivage, H.J. (eds): *The Cancer Chemotherapy Handbook*, 4^a ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993). La quimioterapia de combinación es la administración de más de un agente para tratar el cáncer. Un ejemplo es la administración de un anticuerpo que se une al polipéptido PD-1, PD-L1 o CTLA-4 utilizado en combinación con células, un compuesto radiactivo o un compuesto químico.

CD39 (ENTPD1): Una proteína de membrana integral con dos dominios transmembrana y una gran región extracelular (Maliszewski *et al.*, 1994). Se identificó por primera vez como un marcador de activación en linfocitos humanos y como la ecto-ADPasa vascular (Kaczmarek E *et al.* (1996) *Biol Chem*). El término "CD39" denota la proteína CD39 también denominada ectonucleósido trifosfato difosfoidrolasa-1 (ENTPD1). CD39 in vivo se expresa en células T reguladoras (células Treg), células B y varias células inmunitarias innatas. Desempeña un papel clave en la supresión inmunitaria a través de la hidrólisis de trifosfato de adenosina (ATP) y difosfato de adenosina (ADP) en monofosfato de adenosina (AMP), que a continuación se procesa en adenosina por CD73, una ecto-5'-nucleotidasa. La adenosina es un potente inmunorregulador que, mediante la unión a receptores A2A en células T, mejora la acumulación de AMPc intracelular, evitando así la activación de células T (Deaglio S *et al.*, *JEM*, 2007). La expresión de CD39 y CD73 aumenta en varias neoplasias malignas sólidas humanas (Antonioli Luca *et al.*, *Trends Mol Med*, 2013). La regulación positiva de ambas enzimas se ve favorecida en entornos hipódicos, y su acción concertada secuencial puede desempeñar un papel en el inmunoescape tumoral (Eltzschig HK *et al.*, *Blood* 2009; Ghiringhelli F *et al.*, *J Biomed Biotech*, 2012). Una secuencia de aminoácidos de CD39 específica, no limitante, y una secuencia de ARNm que codifica CD39, se proporciona en

GENBANK® Núm. NM_001776, 1 de mayo de 2017.

CD103: Conocido como la integrina alfa E (ITGAE), CD103 se une a la integrina beta 7 (β 7-ITGB7) para formar la molécula de integrina heterodimérica α E β 7. El principal ligando de α E β 7 es la E-cadherina, una molécula de adhesión que se encuentra en las células epiteliales. Es importante que las células T se dirijan a los sitios intestinales y retengan las células de memoria residentes en el tejido (T_{RM}) en los tejidos. In vivo, CD 103 se expresa en un subconjunto de células dendríticas en el intestino y una población de células T presentes en tejidos periféricos caracterizados como células de memoria residentes en tejidos (T_{RM}) (Schenkel JM et al., Immunity, 2014; Mueller SN et al., Nat Rev Immunol, 2015). CD103 también se expresa en un subconjunto de células T CD8 en cáncer de ovario seroso de alto grado, cáncer de pulmón, carcinoma de células uroteliales de la vejiga y carcinoma de endometrio (Webb JR et al., Clin Cancer Res, 2014; Webb JR et al., Cancer Immunol Res, 2015; Komdeur FL et al., Oncotarget, 2016; Djenidi F et al., J Immunol, 2015; Wang B et al., J Urol, 2015; Workel HH et al., EJC, 2015). En esas neoplasias malignas, las células T CD103+ CD8 se localizan preferentemente dentro del tumor, lo que favorece una interacción directa con las células tumorales. Células T CD103+ CD8 expresan altos niveles de PD-1, una molécula de superficie de activación/agotamiento, que tras la interacción con su ligando PD-L1 da como resultado la inhibición de la proliferación de células T, la supervivencia y las funciones efectoras (Webb JR et al., Cancer Immunol Res, 2015). Una secuencia de aminoácidos de CD103 específica y no limitante, y una secuencia de ARNm que codifica CD103, se proporciona en el N.º de acceso de GENBANK® NM_002208, 20 de mayo de 2017.

Variantes conservadoras: Sustituciones de aminoácidos "conservadoras" son aquellas sustituciones que no afectan o disminuyen sustancialmente la afinidad de una proteína, tal como un anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo humano que se une específicamente a PD-1, PD-L1, BTLA, TIM-3, LAG3 CTLA-4 o 4-1BB, puede incluir como máximo aproximadamente 1, como máximo aproximadamente 2, como máximo aproximadamente 5, y como máximo aproximadamente 10, o como máximo aproximadamente 15 sustituciones conservativas y se une específicamente al polipéptido PD-1, PD-L1, BTLA, TIM-3, LAG3, CTLA-4 o 4-1BB. El término variación conservadora también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido, siempre que el anticuerpo se une específicamente al polipéptido PD-1, PD-L1, BTLA, TIM-3, LAG3, CTLA-4 o 4-1BB. Sustituciones no conservativas son aquellas que reducen una actividad o unión a un polipéptido PD-1, PD-L1, BTLA, TIM-3, LAG3, CTLA-4 o 4-1BB.

Las tablas de sustitución de aminoácidos conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas por un experto en la técnica. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que se consideran sustituciones conservadoras entre sí:

- 30 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Contacto: Colocación en asociación física directa; incluye tanto en forma sólido como en forma líquida.

Nivel de control (parámetro inmune): Un nivel de referencia de un parámetro inmunitario. En algunas realizaciones, un nivel de control es el nivel de un componente del sistema inmunitario, tal como un tipo específico de células, en ausencia de un agente terapéutico. Se puede medir un nivel de control en una muestra de un sujeto que no ha sido tratado con un agente de interés, o una muestra de un sujeto que ha sido tratado con un agente de control. El nivel de control también puede ser un valor estándar, tal como un valor determinado a partir de un promedio de un gran número de muestras a lo largo del tiempo. El nivel de control también se puede medir en una muestra de un sujeto tratado con la dosis específica de un agente terapéutico, donde esa dosis no se administra al sujeto en el momento en que el sujeto está actualmente bajo evaluación. El control puede ser del sujeto bajo evaluación, o puede ser de un sujeto diferente.

Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4): Una proteína también conocida como **CD152**. CTLA-4 es un miembro de la super familia de las inmunoglobulinas. CTLA-4 es un receptor de proteínas que funciona como un punto de control inmunitario y, por lo tanto, regula a la baja las respuestas inmunitarias. CTLA-4 se expresa constitutivamente en células T reguladores (Treg) y se regula positivamente en células T convencionales después de la activación. CLTA4 se une a CD80 o CD86 en la superficie de las células presentadoras de antígeno y es un inhibidor de las células T. Se describen ejemplos no limitantes específicos de una proteína CTLA-4 y un ARNm que codifica CTLA-4, por ejemplo, en el N.º de registro de GENBANK® NM_001037631, 7 de octubre de 2016. Antagonistas de CTLA-4 incluyen agentes que reducen la expresión o actividad de CTLA-4 o inhiben la función de inhibición de células T de CTLA-4, por ejemplo, al unirse específicamente a CTLA-4 e inhibir la unión de CTLA-4 a CD80 o CD86 en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Ejemplos de compuestos incluyen anticuerpos (tales como un anticuerpo anti-CTLA-4), moléculas de ARNi, moléculas antisentido y proteínas negativas dominantes.

Detección (célula o biomolécula): Se refiere a la determinación cuantitativa o cualitativa de la presencia de una biomolécula o tipo de célula específico, tal como una célula T CD8⁺CD39⁺CD103⁺, bajo investigación. Por ejemplo, determinar cuantitativa o cualitativamente la presencia de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ en una muestra de un sujeto. En general, la detección de una molécula biológica, tal como una proteína, ácido nucleico, o la detección de un tipo de célula o proliferación celular específica, requiere realizar un ensayo biológico y no una simple observación. Por ejemplo, los ensayos que utilizan anticuerpos o sondas de ácido nucleico (que pueden estar marcadas), o se pueden usar para detectar proteínas o células, respectivamente. **Diagnóstico** de la eficacia del tratamiento, como con un inhibidor de puntos de control, implica detectar un cambio significativo en una célula o biomolécula, como las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺.

ADN (ácido desoxirribonucleico): El ADN es un polímero de cadena larga que comprende el material genético de la mayoría de los organismos vivos (algunos virus tienen genes que comprenden ácido ribonucleico (ARN)). Las unidades de repetición en los polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales comprende una de las cuatro bases, adenina, guanina, citosina y timina unidas a un azúcar desoxirribosa al que se une un grupo fosfato. Los tripletes de nucleótidos (denominados codones) codifican cada aminoácido en un polipéptido, o una señal de parada. El término codón también se usa para las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARNm donde se transcribe la secuencia de ADN.

A menos que se especifique lo contrario, cualquier referencia a una molécula de ADN pretende incluir el complemento inverso de esa molécula de ADN. Excepto cuando el texto de la presente requiere la monocatenaria, las moléculas de ADN, aunque están escritas para representar solo una sola cadena, abarcan ambas cadenas de una molécula de ADN bicatenaria.

Diagnóstico: Identificar la presencia o naturaleza de una afección patológica, tal como, pero sin limitación, un tumor. Los procedimientos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de verdaderos positivos). La "especificidad" de un ensayo de diagnóstico es uno menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de falsos positivos se define como la proporción de aquellos sin la enfermedad que dan positivo en la prueba. Si bien un procedimiento de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el procedimiento proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico. "Pronóstico" es la probabilidad de desarrollo (por ejemplo, gravedad) de una afección patológica, como un tumor o metástasis.

Codificar: Se dice que un polinucleótido codifica un polipéptido si, en su estado nativo o cuando se manipula por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, puede transcribirse y/o traducirse para producir el ARNm para y/o el polipéptido o un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia codificante se puede deducir de la misma.

Células alimentadoras: Una capa de células como en la parte inferior de una placa de cultivo. Las células alimentadoras pueden liberar nutrientes, factores de crecimiento y / o citocinas en el medio de cultivo y proporcionar un sustrato con el que otras células, tales como células T, pueden interactuar. Las células se pueden irradiar. En una realización, las células alimentadoras son células mononucleares de sangre periférica alogénicas irradiadas.

Inhibidor de punto de control inmunológico: Un tipo de agente que bloquea las vías biológicas en tipos específicos de células del sistema inmunitario, como, entre otros, las células T y algunas células cancerosas. Estos inhibidores inhiben que las células T destruyan las células cancerosas. Cuando se bloquea un inhibidor de puntos de control, se reduce una "inhibición" en el sistema inmunitario y las células T se activan contra las células cancerosas. Ejemplos de proteínas de punto de control que se encuentran en las células T o las células cancerosas incluyen PD-1, PD-L1, CTLA-4, BTLA, TIM-3.

Respuesta inmunitaria: Una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como una célula B, célula T o monocito, a un estímulo. En una realización, la respuesta es específica para un antígeno particular (una "respuesta específica de antígeno"). En una realización, una respuesta inmunitaria es una respuesta de células T, tal como una respuesta CD4+ o una respuesta CD8+. En otra realización, la respuesta es una respuesta de células B y da como resultado la producción de anticuerpos específicos.

La "falta de respuesta" con respecto a las células inmunitarias incluye la refractividad de las células inmunitarias a la estimulación, tal como la estimulación a través de un receptor activador o una citocina. La falta de respuesta puede ocurrir, por ejemplo, debido a la exposición a inmunosupresores o la exposición a altas dosis de antígeno. Como se usa en esta invención, el término "anergia" o "tolerancia" incluye refractividad para activar la estimulación mediada por receptores. Dicha refractividad es en general específica de antígeno y persiste después de que la exposición al antígeno tolerizante ha cesado. Por ejemplo, la anergia en las células T (a diferencia de la falta de respuesta) se caracteriza por la falta de producción de citocinas (como IL-2). La anergia de las células T se produce cuando las células T se exponen al antígeno y reciben una primera señal (un receptor de células T o una señal mediada por CD3) en ausencia de una segunda señal (una señal coestimuladora). En estas condiciones, la reexposición de las células al mismo antígeno (incluso si la exposición ocurre en presencia de una molécula coestimuladora) da como resultado la falta de producción de citocinas y, por lo tanto, la falta de proliferación. Sin embargo, las células T anérgicas pueden montar respuestas a antígenos no relacionados y pueden proliferar si se cultivan con citocinas (como IL-2). Por

ejemplo, la anergia de las células T también se puede observar por la falta de producción de IL-2 por los linfocitos T medida por ELISA o por un ensayo de proliferación usando una línea celular indicadora. Alternativamente, se puede usar una construcción de gen indicador. Por ejemplo, las células T anérgicas no inician la transcripción del gen de IL-2 inducida por un promotor heterólogo bajo el control del potenciador del gen de IL-2 5' o por un multímero de la secuencia AP1 que se puede encontrar dentro del potenciador (Kang et al. Science 257:1134, 1992). Células T específicas de antígeno anérgico pueden tener una reducción de al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso el 100 % en la actividad citotóxica con respecto a una célula T específica de antígeno de control correspondiente.

Inhibición o tratamiento de una enfermedad: Inhibir una enfermedad, como el crecimiento tumoral, se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad o disminuir los efectos fisiológicos del procedimiento de la enfermedad. En varios ejemplos, inhibir o tratar una enfermedad se refiere a disminuir los síntomas de un tumor o una infección con un patógeno. Por ejemplo, el tratamiento del cáncer puede prevenir el desarrollo del síndrome paraneoplásico en una persona que se sabe que tiene un cáncer, o disminuir un signo o síntoma del tumor. En otra realización, el tratamiento de una infección puede referirse a inhibir el desarrollo o disminuir un síntoma de la infección. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o condición patológica relacionada con la enfermedad. La vacunación terapéutica se refiere a la administración de un agente a un sujeto ya infectado con un patógeno. El sujeto puede ser asintomático, de modo que el tratamiento previene el desarrollo de un síntoma.

Aislado: Un componente biológico "aislado", tal como un ácido nucleico, proteína (incluyendo anticuerpos) o célula, se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en el entorno (tal como otras células) donde el componente se produce naturalmente, i.e. otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y orgánulos. Ácidos nucleicos y proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas mediante procedimientos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula huésped, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

Linfocito: Tipo de glóbulo blanco que participa en las defensas inmunitarias del cuerpo. Hay dos tipos principales de linfocitos: Células B y células T.

Gen de activación de linfocitos 3 (LAG3): Una proteína que en humanos está codificada por el gen *LAG3*, también llamado CD223. LAG-3 es una molécula de superficie celular con diversos efectos biológicos sobre la función de las células T, y es un receptor de punto de control inmune. LAG3 regula negativamente la proliferación celular, la activación y la homeostasis de las células T, y se ha informado que desempeña un papel en la función supresora de Treg. Un ejemplo de aminoácido y ARNm que codifica LAG3 humano se proporciona en GENBANK® Accession No. NM_002286.5, 9 de abril de 2017.

Mamífero: Este término incluye mamíferos tanto humanos como no humanos. De manera similar, el término "sujeto" incluye sujetos humanos y veterinarios.

Intensidad de fluorescencia media (citometría de flujo): La citometría de flujo se refiere a la medición de la intensidad de la luz de una célula o partícula, ya sea luz láser dispersada o fluorescencia emitida por un fluorocromo. La luz es detectada por un tubo fotomultiplicador (PMT), que la convierte a través de un amplificador en un voltaje que es proporcional a la intensidad de fluorescencia original y al voltaje en el PMT. Estos voltajes, que son una distribución continua, se convierten en una distribución discreta mediante un convertidor de analógico a digital (ADC), que coloca cada señal en un canal específico según el nivel de fluorescencia. Cuanto mayor sea la resolución del ADC, más cerca reflejará la distribución continua.

Los datos de citometría de flujo se pueden mostrar utilizando una escala lineal o logarítmica. El uso de una escala logarítmica está indicado en la mayoría de las situaciones biológicas donde las distribuciones están sesgadas hacia la derecha. En este caso, el efecto es normalizar la distribución: se dice que es Log Normal y los datos se han transformado logarítmicamente. Las señales lineales llegan a través de un amplificador lineal, pero la transformación logarítmica puede lograrse mediante un amplificador logarítmico o mediante el uso de tablas de consulta (LUT). La mayoría de los ADC en los citómetros analíticos son de 10 bits, es decir, dividen los datos en 2e10 o 1024 canales, aunque existe una tendencia creciente a usar ADC de 12 o 14 bits para dar una mayor resolución de los datos.

Los datos de un solo canal de datos (dispersión o fluorescencia) se muestran como un histograma donde el eje x se divide en 1024 canales (para un ADC de 10 bits). Si los datos están en una escala lineal, el número de canal y el valor lineal para ese canal se obtendrán fácilmente. En una escala logarítmica, el eje x todavía está dividido en 1024 canales, pero se muestra como una escala de 5 décadas logarítmicas (en general, se utilizan 5 décadas logarítmicas).

Para cuantificar los datos citométricos de flujo se utilizan las medidas de la distribución de una población. En general, las medidas de tendencia central son la media y la mediana. La **media** es el "promedio" y puede ser aritmética o geométrica. La media aritmética se calcula como $\Sigma(x_i)/n$, y la media geométrica como $n^{\text{raíz}}(a_1 \times a_2 \times a_3 \dots a_n)$. En general, con los datos amplificados logarítmicamente, se utiliza la media geométrica, ya que tiene en cuenta la ponderación de la distribución de datos, y la media aritmética se utiliza para los datos lineales o los datos que se muestran en una escala lineal. La **mediana** es el valor central, es decir, el percentil 50, donde la mitad de los valores

están por encima y la mitad por debajo. Una célula con expresión "alta" y expresión "baja" se puede determinar relativamente dependiendo de la fluorescencia de toda la población; estos parámetros se visualizan fácilmente en gráficos de datos de citometría de flujo.

Medio (cultivo tisular o cultivo celular): Un conjunto sintético de condiciones de cultivo con los nutrientes necesarios para apoyar el crecimiento (proliferación/expansión celular) de una población específica de células. Los medios en general incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y un tampón para mantener el pH. En una realización, el medio de crecimiento contiene un medio esencial mínimo, tal como RPMI, complementado con diversos nutrientes para mejorar el crecimiento celular. Además, los medios esenciales mínimos pueden complementarse con aditivos tales como suero bovino humano, de ternera o fetal.

Neoplasia, tumor maligno, cáncer o tumor: Una neoplasia es un crecimiento anormal de tejido o células que resulta de una división celular excesiva. El crecimiento neoplásico puede producir un tumor. Un "cáncer" o "tumor" es una neoplasia que ha sufrido una anaplasia característica con pérdida de diferenciación, aumento de la tasa de crecimiento, invasión del tejido circundante y es capaz de metástasis. La cantidad de un tumor en un individuo es la "carga tumoral" que se puede medir como el número, volumen o peso del tumor. Un tumor que no hace metástasis se conoce como "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante y/o puede hacer metástasis se denomina "maligno". El cáncer metastásico es un cáncer en uno o más sitios en el cuerpo que no sea el sitio de origen del cáncer original (primario) del que se deriva el cáncer metastásico.

Ejemplos de tumores hematológicos incluyen leucemias, incluidas las leucemias agudas (como la leucemia linfocítica aguda, la leucemia mielocítica aguda, la leucemia mielógena aguda y la leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), las leucemias crónicas (como la leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, la leucemia mielógena crónica y la leucemia linfocítica crónica), la policitemia vera, el linfoma, la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin (formas indolentes y de alto grado), el mieloma múltiple, la macroglobulinemia de Waldenstrom, la enfermedad de la cadena pesada, el síndrome mielodisplásico, la leucemia de células pilosas y la mielodisplasia.

Ejemplos de tumores sólidos, como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomiosarcoma, carcinoma de colon, malignidad linfoide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga, y tumores del SNC (como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofarioglioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendrogioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

En varios ejemplos, un tumor es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, glioblastoma o cáncer de recto.

Parenteral: Administrado fuera del intestino, *por ejemplo*, no a través del tracto alimentario. En general, las formulaciones parenterales son aquellas que se administrarán a través de cualquier modo posible excepto la ingestión. Este término se refiere especialmente a inyecciones, ya sea administradas por vía intravenosa, intratecal, intramuscular, intraperitoneal, intraarticular o subcutánea, y diversas aplicaciones superficiales incluyendo aplicación intranasal, intradérmica y tópica, por ejemplo.

Agente farmacéutico: Un compuesto o composición química capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra adecuadamente a un sujeto o una célula.

Portadores farmacéuticamente aceptables: Portadores de uso farmacéuticamente aceptables son convencionales. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, por E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15^a Edición, 1975, describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de los anticuerpos descritos en esta invención.

En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales en general comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (tales como formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que se administrarán pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tampones del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

Polinucleótido: El término polinucleótido o secuencia de ácido nucleico se refiere a una forma polimérica de nucleótido de al menos 10 bases de longitud. Un polinucleótido recombinante incluye un polinucleótido que no es inmediatamente contiguo a ambas secuencias codificantes con las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y otra en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del que se deriva. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector; en un plásmido o virus de replicación autónoma; o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc) independiente de otras secuencias. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de cualquiera de los nucleótidos. El término incluye formas de ADN monocatenarias y bicatenarias.

Polipéptido: Cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación postraduccional (por ejemplo, glicosilación o fosforilación). Un polipéptido puede tener entre 3 y 30 aminoácidos de longitud. En una realización, un polipéptido tiene una longitud de aproximadamente 7 a aproximadamente 25 aminoácidos. En aún otra realización, un polipéptido tiene una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos. En aún otra realización, un péptido tiene aproximadamente 9 aminoácidos de longitud. Con respecto a los polipéptidos, "comprende" indica que la secuencia de aminoácidos adicional u otras moléculas se pueden incluir en la molécula, "consiste esencialmente en" indica que las secuencias de aminoácidos adicionales no se incluyen en la molécula, pero que se pueden incluir otros agentes (tales como marcadores o compuestos químicos), y "consiste en" indica que las secuencias de aminoácidos adicionales y los agentes adicionales no se incluyen en la molécula.

Prevenir, tratar o mejorar una enfermedad: "Prevenir" una enfermedad se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad, como un tumor. "Tratar" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o condición patológica después de que ha comenzado a desarrollarse, tal como una reducción en la carga tumoral o una disminución en el número de tamaño de las metástasis. "Mejorar" se refiere a la reducción en el número o la gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad, como el cáncer.

Proteína de muerte celular programada (PD)-1: Las moléculas PD-1 son miembros de la superfamilia del gen de la inmunoglobulina. El PD-1 humano tiene una región extracelular que contiene un dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas, un dominio transmembrana y una región intracelular que incluye un motivo inhibidor a base de tirosina inmunorreceptor (ITEM) ((Ishida et al., EMBO J. 11:3887, 1992; Shinohara et al., Genomics 23:704, 1994; patente de los EE. UU. n.º 5,698,520). Estas características también definen una familia más grande de moléculas, llamadas receptores inmunoinhibidores, que también incluyen gp49B, PIR-B y los receptores inhibidores asesinos (KIR) (Vivier y Daeron (1997) Immunol. Today 18:286). Sin limitarse a la teoría, se cree que el motivo ITIM tirosil fosforilado de estos receptores interactúa con la fosfatasa que contiene el dominio S112, lo que conduce a señales inhibidoras. Un subconjunto de estos receptores inmunoinhibidores se une a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), tales como los KIR, y la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) se une a B7-1 y B7-2. En humanos, PD-1 es un receptor transmembrana tipo I de 50-55 kDa que se identificó originalmente en una línea de células T que sufre apoptosis inducida por activación. PD-1 se expresa en células T, células B y macrófagos. Los ligandos para PD-1 son los miembros de la familia B7 PD-ligando 1 (PD-L1, también conocido como B7-H1) y PD-L2 (también conocido como B7-DC).

In vivo, PD-1 se expresa en células T, células B y monocitos activados. Datos experimentales implican las interacciones de PD-1 con sus ligandos en la regulación negativa de las respuestas inmunitarias central y periférica. En particular, la proliferación en células T de tipo salvaje pero no en células T deficientes en PD-1 se inhibe en presencia de PD-L1. Además, ratones deficientes en PD-1 exhiben un fenotipo autoinmune. Una secuencia de aminoácidos ejemplar de PD-1 humana se expone en Ishida et al., EMBO J. 11:3887, 1992; Shinohara et al. Genomics 23:704, 1994; Pat. de EE. UU. No. 5,698,520):

El acoplamiento de PD-1 (por ejemplo, por reticulación o por agregación) conduce a la transmisión de una señal inhibitoria en una célula inmunitaria, lo que resulta en una reducción de las respuestas inmunitarias concomitantes con un aumento de la anergia de las células inmunitarias. PD-1 se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, ambos de los cuales son polipéptidos de ligando de PD-1 humano, que son miembros de la familia B7 de polipéptidos.

Antagonistas de PD-1 incluyen agentes que reducen la expresión o actividad de un ligando PD 1 (PD-L1) o un ligando PD 2 (PD-L2) o reducen las interacciones entre PD-1 y PD-L1, o PD-L2. Compuestos ejemplares incluyen anticuerpos (tales como un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-PD-L2), moléculas de iARN (tales como moléculas de iARN anti-PD-1, iARN anti-PD-L1 y una iARN anti-PD-L2), moléculas antisentido (tales como un ARN antisentido anti-PD-1, un ARN antisentido anti-PD-L1 y un ARN antisentido anti-PD-L2), proteínas negativas dominantes (tales como una proteína PD-1 negativa dominante, una proteína PD-L1 negativa dominante y una proteína PD-L2 negativa dominante), véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º 2008/083174.

Proliferación: La división de una célula para producir progenie, que se puede medir de varias maneras conocidas en la técnica. Esto incluye, entre otros, ensayos que cuentan la cantidad total de células, ensayos que cuentan la cantidad de células de un tipo celular específico, ensayos de Ki-67, incorporación de timidina y ensayos de bromodesoxiuridina.

Purificado: El término purificado no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación peptídica purificada es aquella donde el péptido o proteína está más enriquecido que el péptido o proteína en su entorno natural dentro de una célula. En una realización, una preparación se purifica

de modo que la proteína o péptido represente al menos el 50 % del contenido total de péptido o proteína de la preparación. La purificación sustancial denota purificación de otras proteínas o componentes celulares. Una proteína sustancialmente purificada tiene al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de pureza. Por lo tanto, en un ejemplo específico, no limitativo, una proteína sustancialmente purificada está 90 % libre de otras proteínas o componentes celulares.

Muestra (muestra biológica): Incluye muestras biológicas que contienen fluidos, tejidos, células y subcomponentes de estos, tales como ADN, ARN y proteínas. Por ejemplo, muestras comunes incluyen biopsia tumoral, médula ósea, bazo, ganglios linfáticos, sangre, por ejemplo, sangre periférica (pero también pueden incluir cualquier otra fuente a partir de la cual se puedan aislar células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺, que incluyen: biopsia de tejido, muestras quirúrgicas, aspirados con aguja fina, material de autopsia y similares).

Agente aglutinante específico: Un agente que se une sustancialmente solo a una diana definida. En una realización, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a un polipéptido PD-1, PD-L1, CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3 o 4-1BB

El término "se une específicamente" se refiere, con respecto a un antígeno tal como el polipéptido PD-1, PD-L1, CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3 o 4-1BB a la asociación preferencial de un anticuerpo u otro ligando, en su totalidad o en parte, con una célula o tejido que porta ese antígeno y no a células o tejidos que carecen de ese antígeno. Por supuesto, se reconoce que puede ocurrir un cierto grado de interacción no específica entre una molécula y una célula o tejido no diana. Sin embargo, la unión específica puede distinguirse como mediada a través del reconocimiento específico del antígeno. Aunque los anticuerpos selectivamente reactivos se unen al antígeno, pueden hacerlo con baja afinidad. La unión específica da como resultado una asociación mucho más fuerte entre el anticuerpo (u otro ligando) y las células que portan el antígeno que entre el anticuerpo (u otro ligando) y las células que carecen del antígeno. La unión específica típicamente da como resultado un aumento mayor de 2 veces, tal como mayor de 5 veces, mayor de 10 veces, o mayor de 100 veces en la cantidad de anticuerpo unido u otro ligando (por unidad de tiempo) a una célula o tejido que porta el polipéptido en comparación con una célula o tejido que carece del polipéptido. La unión específica a una proteína en tales condiciones requiere un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína particular. Una variedad de formatos de inmunoensayo son apropiados para seleccionar anticuerpos u otros ligandos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se utilizan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

Sujeto: Organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye sujetos tanto humanos como veterinarios, incluidos mamíferos humanos y no humanos.

Célula T: Un glóbulo blanco crítico para la respuesta inmunitaria. Células T incluyen, pero no se limitan a, células T CD4⁺ y células T CD8⁺. Un linfocito T CD4⁺ es una célula inmunitaria que lleva un marcador en su superficie conocido como "grupo de diferenciación 4" (CD4). Estas células, también conocidas como células T auxiliares, ayudan a orquestar la respuesta inmune, incluidas las respuestas de anticuerpos y las respuestas de células T asesinas. Células T CD8⁺ llevan el marcador "grupo de diferenciación 8" (CD8). En una realización, una célula T CD8⁺ es un linfocito T citotóxico. En otra realización, una célula CD8⁺ es una célula T supresora. Una célula T se "activa" cuando puede responder a un antígeno específico de interés presentado en una célula presentadora de antígeno.

Inmunoglobulina de células T que contiene el dominio de mucina 3 (TIM-3): Una proteína que en humanos está codificada por el gen HAVCR2. TIM3 es un punto de control inmunitario que es una proteína de superficie celular específica de Th1 que regula la activación de macrófagos y mejora la gravedad de la encefalomielitis autoinmunitaria experimental en ratones. La vía de Tim-3 puede interactuar con la vía de PD-1 en las células T CD8⁺ agotadas en el cáncer. Una secuencia de ARNm y proteína ejemplar para TIM-3 humana se proporciona en GENBANK® Accession No. NM_032782.4, 30 de abril de 2017.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Una cantidad de una sustancia específica suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que se está tratando. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad necesaria para inhibir o suprimir el crecimiento de un tumor. En una realización, una cantidad terapéuticamente efectiva es la cantidad necesaria para eliminar, reducir el tamaño o prevenir la metástasis de un tumor. Cuando se administra a un sujeto, en general se usará una dosificación que logrará concentraciones tisulares diana (por ejemplo, en tumores) que se ha demostrado que logra un efecto *in vitro* deseado.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos (incluidos los términos técnicos y científicos) utilizados en esta invención tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenecen esta descripción. Los términos singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, "que comprende A o B" significa que incluye A, o B, o A y B. Además, debe entenderse que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan para su descripción.

Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta invención en la práctica o prueba de la presente descripción, los procedimientos y materiales adecuados se describen a continuación.

Todos los números de acceso de GENBANK® son citados en esta invención tal como aparecen en la base de datos el 1 de junio de 2017. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones de términos, prevalecerá. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Procedimientos de tratamiento: Inmunoterapia adoptiva

En esta invención se describen procedimientos para el tratamiento de un sujeto de interés, tal como un sujeto con un tumor. Los procedimientos incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ autólogas. La administración de las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ autólogas purificadas, como se describe en esta invención, aumentará la capacidad de un sujeto para provocar una respuesta inmune, tal como a un tumor. Por lo tanto, al purificar y generar una población purificada de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ seleccionadas de un sujeto *ex vivo* e introducir una cantidad terapéutica de estas células, se mejora la respuesta inmunitaria del sujeto receptor para tratar el tumor autólogo. También se pueden administrar agentes adicionales al sujeto, como se analiza a continuación. El sujeto puede ser un ser humano o un sujeto veterinario.

En un ejemplo, el procedimiento requiere aislar del donante una población de células donantes que incluyen células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ (tales como células mononucleares de sangre periférica o células T de una biopsia tumoral), y opcionalmente expandir las células. Se administra al receptor una cantidad terapéuticamente efectiva de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺, produciendo así una respuesta inmune al tumor en el receptor. Dichas células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ pueden destruir células que contienen el antígeno asociado al tumor o ayudar a otras células inmunitarias. En algunas realizaciones, se pueden administrar agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos.

En varias realizaciones, el procedimiento también incluye administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de CTLA-4, antagonista de BTLA, antagonista de TIM-3, antagonista de LAG3 y/o un agonista de 4-1BB al sujeto. La administración de un antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de CTLA-4, antagonista de BTLA, antagonista de TIM-3, antagonista de LAG3 y/o un agonista de 4-1BB se describe en detalle a continuación. La administración de una cantidad terapéutica de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ y una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de CTLA-4, antagonista de BTLA, antagonista de TIM-3, antagonista de LAG3 y/o un agonista de 4-1BB se puede utilizar profilácticamente para prevenir la recurrencia del tumor en el receptor, o para tratar una recaída del tumor.

Las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ son autólogas. Sin embargo, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ también pueden reaccionar a MHC coincidentes de donantes alogénicos. En general, las células T son positivas para la expresión de CD3, CD8, CD39 y CD103. Por ejemplo, se puede usar la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para identificar (y clasificar si se desea) poblaciones de células que son positivas para CD3, CD8, CD39 y CD103 mediante el uso de anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-CD39 y anti-CD 103 de diferentes colores. En resumen, una población de células, tales como células mononucleares de sangre periférica o células T de una biopsia tumoral se incuban en presencia de anticuerpos anti-CD103, anti-CD8, anti-CD39 y opcionalmente anti-CD3 (cada uno con un fluoróforo diferente unido), durante un tiempo suficiente para que el anticuerpo se une a las células. Despues de eliminar el anticuerpo no unido, las células se analizan mediante FACS utilizando procedimientos de rutina. En ejemplos específicos, la población resultante de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ son al menos 30 % puras en relación con la población total de células CD8+ positivas, tal como al menos alrededor de 50 % puras, al menos alrededor de 60 % puras, al menos alrededor de 70 % puras, al menos alrededor de 80 % puras, al menos alrededor de 90 % puras, al menos alrededor de 95 % puras, o al menos alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 % o alrededor de 99 % puras en relación con la población total de células CD8 positivas. Por lo tanto, solo se administra un número limitado de células heterólogas. Las células se pueden procesar para más de una ronda de clasificación de células. Las poblaciones de células T pueden analizarse para detectar micoplasmas, esterilidad, endotoxinas y control de calidad para la función y pureza antes de la crioconservación o antes de la infusión en el receptor.

Anticuerpos marcados específicamente dirigidos a uno o más marcadores de superficie celular se pueden usar para identificar, cuantificar y/o aislar células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ y poblaciones de estas células que expresan marcadores adicionales. Los anticuerpos se pueden conjugar con otros compuestos incluyendo, entre otros, enzimas, perlas magnéticas, perlas magnéticas coloidales, haptenos, fluorocromos, compuestos metálicos, compuestos radiactivos o fármacos. Las enzimas que se pueden conjugar con los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina, peroxidasa, ureasa y B-galactosidasa. Los fluorocromos que se pueden conjugar con los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, isotiocianato de fluoresceína, isotiocianato de tetrametilrodamina, ficoeritrina, aloficiocianinas y Texas Red. Para fluorocromos adicionales que se pueden conjugar con anticuerpos, véase Haugland, R. P., *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, published by Molecular Probes, 9^a Edición (2002). Los compuestos metálicos que se pueden conjugar con los anticuerpos incluyen, entre otros, ferritina, oro coloidal y, en particular, perlas superparamagnéticas coloidales. Los haptenos que se pueden conjugar con los anticuerpos incluyen, entre otros, biotina, digoxigenina, oxazalona y nitrofenol. Los compuestos radiactivos que se pueden conjugar o incorporar en los anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, tecnecio 99 (⁹⁹Tc), ¹²⁵I y aminoácidos que comprenden cualquier radionúclido, que incluyen, entre otros, ¹⁴C, ³H y ³⁵S.

En algunos ejemplos, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se aislan poniendo en contacto las células de una muestra biológica, como una muestra de sangre periférica o una muestra tumoral, con un anticuerpo marcado adecuadamente. Sin embargo, se pueden emplear otras técnicas de diferente eficacia para purificar y aislar las poblaciones de células deseadas. Las técnicas de separación empleadas deben maximizar la retención de la viabilidad de la fracción de las células a recolectar. La técnica particular empleada, por supuesto, dependerá de la eficiencia de la separación, la citotoxicidad del procedimiento, la facilidad y la velocidad de la separación, y qué equipo y/o habilidad técnica se requiere.

Los datos generados por los citómetros de flujo se pueden trazar en una sola dimensión, para producir un histograma, o en gráficos de puntos bidimensionales o incluso en tres dimensiones. Las regiones en estas gráficas se pueden separar secuencialmente, según la intensidad de fluorescencia, mediante la creación de una serie de extracciones de subconjuntos, denominadas "compuertas". En la técnica se conocen protocolos de compuerta específicos. Los gráficos en general se realizan en escalas logarítmicas. Debido a que los diferentes espectros de emisión de los tintes fluorescentes se superponen, las señales en los detectores se compensan electrónicamente y computacionalmente. Los datos acumulados utilizando el citómetro de flujo se pueden analizar utilizando software como FLOWJO® o BD FACSDiva®. El análisis se realiza con mayor frecuencia en un ordenador separado. Los principios de compuertas, que permiten la identificación de células que expresan niveles altos o bajos de una proteína de interés, son bien conocidos en la técnica. Se proporcionan tutoriales para aprender a establecer compuertas, por ejemplo, y el sitio web de FLOWJO®. En general, un experto en la técnica puede usar fácilmente cualquier máquina FACS y programas informáticos para el análisis de datos para establecer compuertas para separar células que expresan un marcador particular. Como ejemplo, un experto en la técnica puede identificar fácilmente células donde la expresión de CD8 está ausente (CD8⁻), la expresión de CD8 está presente (CD8⁺).

Procedimientos de separación adicionales pueden incluir separación magnética, usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos, ya sea unidos a un anticuerpo monoclonal o usados junto con complemento, y "cribado (panning)", que utiliza un anticuerpo monoclonal unido a una matriz sólida, u otra técnica conveniente. Anticuerpos unidos a perlas magnéticas y otras matrices sólidas, tales como perlas de agarosa, perlas de poliestireno, membranas de fibra hueca y placas de Petri de plástico, permiten la separación directa. Células que están unidas por el anticuerpo pueden retirarse de la suspensión celular simplemente separando físicamente el soporte sólido de la suspensión celular. Las condiciones exactas y la duración de la incubación de las células con los anticuerpos unidos a la fase sólida dependerán de varios factores específicos del sistema. La selección de condiciones apropiadas, sin embargo, es bien conocida en la técnica.

Células no unidas a continuación pueden eluirse o lavarse con tampón fisiológico después de que se haya permitido el tiempo suficiente para que las células expresen un marcador de interés (tal como, pero sin limitarse a, CD8, CD39, CD103 y opcionalmente CD3, para unirse a los anticuerpos unidos a la fase sólida. Luego, las células unidas se separan de la fase sólida mediante cualquier procedimiento apropiado, dependiendo principalmente de la naturaleza de la fase sólida y del anticuerpo empleado, y se cuantifican utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. En un ejemplo específico no taxativo, las células unidas separadas de la fase sólida se cuantifican mediante FACS (véase más arriba).

Anticuerpos se pueden conjugar con biotina, que a continuación se puede eliminar con avidina o estreptavidina unida a un soporte, o fluorocromos, que se pueden utilizar con FACS para permitir la separación y cuantificación celular, como se conoce en la técnica.

En otra realización, se puede usar un procedimiento de aféresis que emplea un instrumento de aféresis automatizado (tal como el separador de células sanguíneas CS-3000, Baxter Health Care, Deerfield, IL o una máquina equivalente) para recolectar células de un sujeto. En un ejemplo específico, no limitante, los anticuerpos marcados específicamente dirigidos a uno o más marcadores de superficie celular se utilizan para identificar y cuantificar las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ tales como las células descritas en esta invención.

En algunas realizaciones, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se expanden in vitro antes de la administración al sujeto. A continuación, se describen los procedimientos de expansión.

La presente descripción también proporciona composiciones terapéuticas que incluyen las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ enriquecidas (tales como purificadas) y opcionalmente un antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de CTLA-4, antagonista de BTLA, antagonista de TIM-3, antagonista de LAG3 y/o un agonista de 4-1BB. Las composiciones son útiles en el tratamiento de un sujeto con un tumor autólogo. En ejemplos particulares, una población de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se coloca en una forma de dosis terapéutica para su administración a un sujeto que las necesita. El antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de CTLA-4, antagonista de BTLA, antagonista de TIM-3, antagonista de LAG3 y/o un agonista de 4-1BB también está presente en una forma de dosis terapéutica para la administración a un sujeto que necesita tratamiento.

Se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺. Ejemplos no taxativos específicos de una cantidad terapéuticamente eficaz de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ incluyen células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ purificadas administradas a una dosis de aproximadamente 1 X 10⁵ células por kilogramo de sujeto a aproximadamente 1 X 10⁹ células por kilogramo de sujeto, tal como de aproximadamente 1 X 10⁶ células por

kilogramo a aproximadamente 1×10^8 células por kilogramo, tal como de aproximadamente 5×10^6 células por kilogramo a aproximadamente 75×10^6 células por kilogramo, tal como a aproximadamente 25×10^6 células por kilogramo, o a aproximadamente 50×10^6 células por kilogramo.

Células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ purificadas se pueden administrar en dosis únicas o múltiples según lo determine un médico. Por ejemplo, las células pueden administrarse a intervalos de aproximadamente un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas o mensualmente dependiendo de la respuesta deseada y la respuesta obtenida. En algunos ejemplos, una vez que se obtiene la respuesta deseada, no se administran más células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺. Sin embargo, si el receptor presenta uno o más síntomas asociados con el tumor, se puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ en ese momento.

La administración puede ser local o sistémica. En algunas realizaciones, las células se administran por vía intravenosa después de que el sujeto se trata con quimioterapia. En otras realizaciones, al sujeto también se le administran citocinas, tales como IL-2 y/o IL-15, para apoyar la proliferación de las células administradas.

Las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ purificadas descritas en esta invención se pueden administrar con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina. El antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de CTLA-4, antagonista de BTLA, antagonista de TIM-3, antagonista de LAG3 y/o un agonista de 4-1BB también se pueden formular en un portador farmacéuticamente aceptable, como se describe a continuación. Estos se pueden formular en una sola composición o en dos composiciones separadas. En algunos ejemplos, se administran otros agentes terapéuticos con las células T. Se pueden administrar otros agentes terapéuticos antes, durante o después de la administración de las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺, dependiendo del efecto deseado. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antimicrobianos, estimulantes inmunitarios tales como interferón alfa, agentes quimioterapéuticos o vacunas peptídicas utilizadas para estimular las células T *in vitro*. En un ejemplo particular, las composiciones que contienen células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ también incluyen el uno o más agentes terapéuticos. El uso de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ puede reducir el volumen tumoral, la metástasis tumoral, la recurrencia tumoral,

En general, los procedimientos incluyen seleccionar un sujeto que tiene un tumor, tal como un tumor benigno o maligno, y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de (1) células T autólogas CD8⁺CD39⁺CD103⁺ y (2) un antagonista inhibidor de punto de control, tal como un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1, un antagonista de BTLA, un antagonista de TIM-3, un antagonista de LAG3 o un antagonista de CTLA-4, o un agonista de 4-1BB. El antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de BTLA, antagonista de TIM-3, antagonista de LAG3 o antagonista de CTLA-4, o el agonista de 4-1BB, puede, en algunos ejemplos no taxativos, ser un anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno del mismo) que se une específicamente a PD-1, PD-L1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, LAG3, BTLA, CTLA-4 o 4-1BB, respectivamente. Las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ son útiles para tratar el tumor, tal como para reducir el volumen tumoral, reducir o prevenir la metástasis, prevenir la conversión de un tumor benigno en maligno y/o prevenir o inhibir la reaparición del tumor. La administración puede ser local o sistémica. Los procedimientos de administración adecuados son conocidos por un médico.

En algunas realizaciones, una ventaja de los procedimientos proporcionados en esta invención es que la combinación de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ con inhibidores de puntos de control tales como un antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de BTLA, antagonista de TIM-3, antagonista de LAG3 y/o un antagonista de CTLA-4, o un agonista de 4-1BB, permite una dosificación reducida de agentes activos para la terapia contra el cáncer, al tiempo que reduce cualquier efecto secundario no deseado correspondiente (tal como citotoxicidad) de la terapia. En realizaciones adicionales, otra ventaja de los procedimientos proporcionados en esta invención es que la combinación de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ con inhibidores de puntos de control tales como un antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de BTLA, antagonista de TIM-3, antagonista de LAG3 y/o un antagonista de CTLA-4, o con un agonista de 4-1BB, para tratar el tumor, tal como para reducir el volumen tumoral, reducir o prevenir la metástasis, prevenir la conversión de un tumor benigno a uno maligno y/o prevenir o inhibir la recurrencia del tumor. En realizaciones adicionales, la combinación de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ con inhibidores de puntos de control tales como un antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de BTLA, antagonista de TIM-3, antagonista de LAG3 y/o un antagonista de CTLA-4, o un agonista de 4-1BB permite una mayor supervivencia.

También se pueden administrar agentes adicionales al sujeto de interés, tales como, pero sin limitación, agentes terapéuticos contra el cáncer. También se pueden administrar tratamientos adicionales al sujeto, tales como, pero sin limitación, resección quirúrgica del tumor.

El sujeto se puede seleccionar para el tratamiento. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de diagnóstico (tal como un ensayo inmunohistoquímico (IHC) en el tumor (o una muestra en el tumor) para identificar al sujeto como uno que probablemente responda al procedimiento de tratamiento descrito. A continuación, se describen los procedimientos de selección.

En realizaciones adicionales, el sujeto se selecciona para el tratamiento si el tumor da positivo para la expresión de PD-L1 o PD-L2 mediante un ensayo de IHC. Ensayos ejemplares para detectar un tumor que da positivo para la expresión de PD-L1 se proporcionan en Topalian et al. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N. Engl. J. Med. 366:2443-2454; Wolchok et al. 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced

melanoma. N. Engl. J. Med. 369:122-133; Herbst et al. 2014. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature. 515:563-567; Garon et al. 2015. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. N. Engl. J. Med. 372:2018-2028; y Reck et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. N. Engl. J. Med. 375:1823-1833.

5 El tumor puede ser benigno o maligno. El tumor puede ser cualquier tumor de interés, que incluye, entre otros, un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células renales de cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, glioblastoma o cáncer rectal. El cáncer de pulmón puede ser de células pequeñas o carcinoma de células no pequeñas del pulmón. El cáncer de hígado puede ser un carcinoma hepático. El cáncer de mama puede ser un cáncer de mama triple negativo. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor de cabeza y cuello, tal como tumores de la cavidad nasal, senos paranasales, nasofaringe, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, glándulas salivales y paragangliomas. Ejemplos adicionales son tumores de piel, tumores cerebrales, carcinomas cervicales, carcinomas testiculares, tumores del tracto gastrointestinal, tumores del sistema genitourinario, tumores del sistema ginecológico, tumores del sistema endocrino, un sarcoma de tejido blando y hueso, un mesotelioma, un melanoma, una neoplasia del sistema nervioso central o una leucemia.

10

15

En otras realizaciones, el tumor es un tumor de pulmón, tal como un cáncer de pulmón de células no pequeñas o un cáncer de pulmón de células pequeñas. En realizaciones adicionales, el tumor puede ser un tumor del tracto gastrointestinal, tal como cáncer de esófago, estómago, páncreas, hígado, árbol biliar, intestino delgado, colon, recto y región anal. En otras realizaciones más, el tumor puede ser un tumor del sistema genitourinario, tal como cáncer de riñón, uretra, vejiga, próstata, uretra, pene y testículo. En algunas realizaciones, el tumor es un tumor ginecológico, tal como cáncer de cuello uterino, vagina, vulva, cuerpo uterino, enfermedades trofoblásticas gestacionales, ovario, trompa de Falopio, peritoneal o mama. En otras realizaciones, el tumor es un tumor del sistema endocrino, tal como un tumor de tiroides, tumor de paratiroides, tumor de la corteza suprarrenal, tumor endocrino pancreático, tumor carcinoide y síndrome carcinoide. El tumor puede ser un sarcoma de tejido blando y hueso, un mesotelioma, un cáncer de piel, un melanoma, que comprende melanomas cutáneos y melanomas intraoculares, una neoplasia del sistema nervioso central, un cáncer de la infancia, que comprende retinoblastoma, tumor de Wilm, neurofibromatosis, neuroblastoma, familia de tumores de sarcoma de Ewing, rhabdomiosarcoma. El tumor puede ser un linfoma, que comprende linfomas no Hodgkin, linfomas cutáneos de células T, linfoma primario del sistema nervioso central y enfermedad de Hodgkin. El tumor puede ser una leucemia, tal como leucemia aguda, leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica. El tumor puede ser neoplasias de células plasmáticas, un cáncer de sitio primario desconocido, una carcinomatosis peritoneal, un sarcoma de Kaposi, linfomas asociados al SIDA, linfoma primario del sistema nervioso central asociado al SIDA, enfermedad de Hodgkin asociada al SIDA y cánceres anogenitales asociados al SIDA, un cáncer metastásico al hígado, cáncer metastásico al hueso, derrames pleurales y pericárdicos malignos y ascitis maligna.

35 En algunas realizaciones, el tratamiento del tumor se inicia tras el diagnóstico del tumor, o tras el inicio de una afección precursora (tal como displasia o desarrollo de un tumor benigno). El tratamiento se puede iniciar en las primeras etapas del cáncer, por ejemplo, se puede iniciar antes de que un sujeto manifieste síntomas de una afección, como durante un diagnóstico de etapa I o en el momento en que se diagnostica la displasia o se diagnostica una afección proliferativa *in situ*. Sin embargo, el tratamiento puede iniciarse durante cualquier etapa de la enfermedad, tal como, pero sin limitarse a, cánceres en etapa I, etapa II, etapa III y etapa IV. En algunos ejemplos, el tratamiento se administra a estos sujetos con un tumor benigno que puede convertirse en un tumor maligno o incluso metastásico.

40

45

El tratamiento previo al desarrollo de la afección, tal como el tratamiento tras la detección de displasia o una afección precursora temprana (benigna), se denomina en esta invención tratamiento de un sujeto que está "en riesgo" de desarrollar la afección. En algunas realizaciones, la administración de una composición puede realizarse durante o después de la aparición de las afecciones descritas en esta invención. Las composiciones se pueden administrar a un sujeto con riesgo de desarrollar el tumor

La presencia de un tumor se puede determinar mediante procedimientos conocidos en la técnica, y típicamente incluyen evaluación citológica y morfológica. El tumor puede ser un tumor establecido. Las células pueden ser *in vivo* o *ex vivo*, incluidas las células obtenidas de una biopsia.

50 El tratamiento iniciado después del desarrollo de una afección, como el cáncer maligno, puede resultar en la disminución de la gravedad de los síntomas de una de las afecciones, o en la eliminación completa de los síntomas, o en la reducción de la metástasis, el volumen tumoral o el número de tumores. En algún ejemplo, el tumor se vuelve indetectable después del tratamiento.

55 En un aspecto de la descripción, la formación de tumores, tales como metástasis, se retrasa, previene o disminuye. En otro aspecto, el tamaño del tumor primario disminuye. En un aspecto adicional, un síntoma del tumor disminuye. En otro aspecto más, el volumen tumoral disminuye. En otro aspecto más, la recurrencia del tumor se retrasa o previene, tal como durante 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 2, 22, 23 o 24 meses, o durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años.

En algunas realizaciones, se puede medir la respuesta inmunitaria, se puede medir el volumen tumoral, se puede medir la cantidad de lesiones metastásicas y/o se puede medir un síntoma de un tumor.

Una dosis terapéuticamente eficaz puede aumentar la respuesta inmunitaria, disminuir el volumen tumoral, disminuir el número y/o el tamaño de las metástasis y/o disminuir uno o más síntomas del tumor.

- 5 Si bien los procedimientos y composiciones descritos se usarán típicamente para tratar sujetos humanos, también se pueden usar para tratar enfermedades similares o idénticas en otros vertebrados, como otros primates, perros, gatos, caballos y vacas. Un médico puede determinar mejor un formato de administración adecuado para cada sujeto individualmente. Se describen diversos portadores farmacéuticamente aceptables y su formulación en tratados de formulación estándar, *por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences* de E. W. Martin. Véase también Wang, Y. J. y Hanson, M. A., *Journal of Parenteral Science and Technology*, Technical Report N.º 10, Supl. 42: 2S, 1988. La forma de dosificación de la composición farmacéutica se determinará por el modo de administración elegido.

10 Células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se pueden administrar de forma local o sistémica, por cualquier vía. Por ejemplo, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se pueden administrar por vía intratumoral, intraperitoneal, intravenosa. En un ejemplo no taxativo, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se pueden administrar por vía intravenosa. Un antagonista de PD-1, PD-L1, PD-L2, BTLA, TIM-3, LAG3 o CTLA-4 (o un agonista de 4-1BB) también se puede administrar por cualquier vía, incluida la administración parenteral, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal o intraarticular, o por administración sublingual, oral, tópica, intranasal o transmucosa, o por inhalación pulmonar. En algunas realizaciones, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ y/o el antagonista de PD-1, PD-L1, PD-L2, BTLA, TIM-3, LAG3 o CTLA-4 se administran a un tejido donde se encuentra el tumor, o directamente en el tumor (intratumoral). Cuando se proporciona una composición parenteral, *por ejemplo*, para inyección o infusión, los agentes activos en general se suspenden en un portador acuoso, por ejemplo, en una solución tampón isotónica a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, preferentemente a un pH de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,4, 3,5 a 6,0 o 3,5 a aproximadamente 5,0. Tampones útiles incluyen tampones de citrato de sodio-ácido cítrico y fosfato de sodio-ácido fosfórico, y acetato de sodio-ácido acético. Se puede usar una forma de preparación de liberación lenta de reposición o "depósito" para que las cantidades terapéuticamente eficaces de la preparación se administren en el torrente sanguíneo durante muchas horas o días después de la inyección o administración transdérmica.

15 En determinadas realizaciones, el antagonista de PD-1, PD-L1, PD-L2, BTLA, TIM-3, LAG3 o CTLA-4 (tal como, de modo no taxativo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno), o el agonista de 4-1BB se puede administrar a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,01-10 mg/kg, 0,01-5 mg/kg, 0,01-1 mg/kg, 0,01-0,1 mg/kg, 1-10 mg/kg, 1-5 mg/kg, 1-3 mg/kg, 0,5-1,0 mg/kg, 0,05-0,5 mg/kg, según un programa de dosificación de administración que incluye, de modo no taxativo, diariamente, 2 o 3 veces por semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente, etc., u otro programa de dosificación y dosificación que el médico tratante considere apropiado. Como parte de la terapia de combinación,

20 30 las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se pueden administrar al sujeto antes, después o simultáneamente con el agente adicional, siempre que el programa de administración proporcione concentraciones fisiológicas suficientes de los agentes para proporcionar un beneficio terapéutico.

25 En algunas realizaciones, el antagonista de PD-1 o PD-L1 (tal como un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a PD-1 o PD-L1) se puede administrar a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,01-10 mg/kg, 0,01-5 mg/kg, 0,01-1 mg/kg, 0,01-0,1 mg/kg, 1-10 mg/kg, 1-5 mg/kg, 1-3 mg/kg, 0,5-1,0 mg/kg, 0,05-0,5 mg/kg, según un programa de administración que incluye, de modo no taxativo, diariamente, 2 o 3 veces por semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente, etc., u otra dosis y programa de dosificación que el médico tratante considere apropiado. Como parte de la terapia de combinación, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se pueden administrar al sujeto antes, después o simultáneamente con el antagonista de PD-1 o PD-L1, siempre que el programa de administración proporcione concentraciones fisiológicas suficientes de los agentes para proporcionar un beneficio terapéutico. En determinadas realizaciones, el antagonista de CTLA-4 (tal como un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a CTLA-4) se puede administrar a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,01-10 mg/kg, 0,01-5 mg/kg, 0,01-1 mg/kg, 0,01-0,1 mg/kg, 1-10 mg/kg, 1-5 mg/kg, 1-3 mg/kg, 0,5-1,0 mg/kg, 0,05-0,5 mg/kg, según un programa de dosificación de administración que incluye, de modo no taxativo, diariamente, 2 o 3 veces por semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente, etc., u otra dosis y programa de dosificación que el médico tratante considere apropiados. Como parte de la terapia de combinación, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se pueden administrar al sujeto antes, después o simultáneamente con el antagonista de CTLA-4, siempre que el programa de administración proporcione concentraciones fisiológicas suficientes de los agentes para proporcionar un beneficio terapéutico. En realizaciones adicionales, el antagonista de BTLA (tal como un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a BTLA) se puede administrar a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,01-10 mg/kg, 0,01-5 mg/kg, 0,01-1 mg/kg, 0,01-0,1 mg/kg, 1-10 mg/kg, 1-5 mg/kg, 1-3 mg/kg, 0,5-1,0 mg/kg, 0,05-0,5 mg/kg, según un programa de dosificación de administración que incluye, de modo no taxativo, diariamente, 2 o 3 veces por semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente, etc., u otra dosis y programa de dosificación que el médico tratante considere apropiado. Como parte de la terapia de combinación, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se pueden administrar al sujeto antes, después o simultáneamente con el antagonista de BTLA, siempre que el

programa de administración proporcione concentraciones fisiológicas suficientes de los agentes para proporcionar un beneficio terapéutico.

En realizaciones adicionales, el antagonista de LAG3 o TIM-3 (tal como un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a LAG3 o TIM-3) se puede administrar a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,01-10 mg/kg, 0,01-5 mg/kg, 0,01-1 mg/kg, 0,01-0,1 mg/kg, 1-10 mg/kg, 1-5 mg/kg, 1-3 mg/kg, 0,5-1,0 mg/kg, 0,05-0,5 mg/kg, según un programa de dosificación de administración que incluye, entre otros, diariamente, 2 o 3 veces por semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente, etc., u otra dosis y programa de dosificación que el médico tratante considere apropiado. Como parte de la terapia de combinación, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se pueden administrar al sujeto antes, después o simultáneamente con el antagonista de LAG3 o TIM-3, siempre que el programa de administración proporcione concentraciones fisiológicas suficientes de los agentes para proporcionar un beneficio terapéutico. En aun otras realizaciones, el agonista de 4-1BB (tal como un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une específicamente a 4-1BB) se puede administrar a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,01-10 mg/kg, 0,01-5 mg/kg, 0,01-1 mg/kg, 0,01-0,1 mg/kg, 1-10 mg/kg, 1-5 mg/kg, 1-3 mg/kg, 0,5-1,0 mg/kg, 0,05-0,5 mg/kg, según un programa de dosificación de administración que incluye, de modo no taxativo, diariamente, 2 o 3 veces por semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas, mensualmente, etc., u otra dosis y programa de dosificación que el médico tratante considere apropiado. Como parte de la terapia de combinación, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se pueden administrar al sujeto antes, después o simultáneamente con el agonista 4-1BB, siempre que el programa de administración proporcione concentraciones fisiológicas suficientes de los agentes para proporcionar un beneficio terapéutico.

Se pueden utilizar composiciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida incluyen materiales poliméricos adecuados (tales como, por ejemplo, matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, *por ejemplo*, películas o microcápsulas), materiales hidrófobos adecuados (tales como, por ejemplo, una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, y derivados moderadamente solubles (tales como, por ejemplo, una sal moderadamente soluble). Las formulaciones de liberación sostenida pueden administrarse por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como por polvos, ungüentos, geles, gotas o parche transdérmico), bucal o como un aerosol oral o nasal, dependiendo de la ubicación del tumor.

Portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en los procedimientos descritos son convencionales. Por ejemplo, las formulaciones parenterales en general comprenden fluidos inyectables que son vehículos fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, otras soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares. Excipientes que se pueden incluir son, por ejemplo, proteínas, tales como albúmina de suero humano o preparaciones de plasma. Si se desea, la composición farmacéutica que se administrará también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y

Agentes tamponantes de pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán. Procedimientos reales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en la técnica.

Células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ y/o el antagonista de PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, TIM-3, BTLA o CTLA-4 se pueden formular en forma de dosificación unitaria, adecuada para la administración individual de dosificaciones precisas. La cantidad de compuesto(s) activo(s) administrado(s) dependerá del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección y la forma de administración, y es mejor dejarlo al juicio del médico prescriptor. Dentro de estos límites, la formulación que se administrará contendrá una cantidad de componente(s) activo(s) en cantidades eficaces para lograr el efecto deseado en el sujeto que se está tratando. Se prevén múltiples tratamientos, como en intervalos de tiempo definidos, como diarios, quincenales, semanales, bimensuales o mensuales, de modo que se logre la administración crónica.

Se pueden administrar agentes adicionales, tales como una citocina, una quimiocina o un agente quimioterapéutico. Estos se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas descritas. Se puede administrar una citocina, como la interleucina-2 (IL-2), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o el interferón, como el interferón (IFN) β. En un ejemplo, para la prevención y el tratamiento del cáncer, el tratamiento quirúrgico se puede administrar al sujeto. En un ejemplo, esta administración es secuencial. En otros ejemplos, esta administración es simultánea.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos son agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales u hormonas y sus antagonistas. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostazas de nitrógeno (tales como mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, mostaza de uracilo o clorambucilo), sulfonatos de alquilo (tales como busulfano), nitrosoureas (tales como carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina o dacarbazine). Ejemplos de antimetabolitos incluyen análogos de ácido fólico (como metotrexato), análogos de pirimidina (como 5-FU o citarabina) y análogos de purina, como mercaptopurina o tioguanina. Ejemplos de productos naturales incluyen alcaloides de la vinca (tales como vinblastina, vincristina o vindesina), epipodofitoloxinas (tales como etopósido o tenipósido), antibióticos (tales como dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicamicina o mitomicina C) y enzimas (tales como L-asparaginasa). Ejemplos de agentes diversos incluyen los complejos de coordinación de platino (como cis-diamina-dicloroplatino II, también conocido como cisplatino), las ureas sustituidas (como la hidroxiurea), los derivados de

metilhidrazina (como la procarbazina) y los supresores adrenocróticos (como el mitotano y la aminoglutetimida). Ejemplos de hormonas y antagonistas incluyen adrenocorticosteroides (como prednisona), progestinas (como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de magestrol), estrógenos (como dietilestilbestrol y etinil estradiol), antiestrógenos (como tamoxifeno) y andrógenos (como propionato de testimonio y fluoximesterona). Ejemplos de los fármacos quimioterapéuticos más utilizados incluyen Adriamicina, Alkeran, Ara-C, BiCNU, Busulfán, CCNU,

Carboplatino, Cisplatino, Citoxano, Daunorrubicina, DTIC, 5-FU, Fludarabina, Hidrea, Idarrubicina, Ifosfamida, Metotrexato, Mitramicina, Mitomicina, Mitoxantrona, Mostaza nitrogenada, Taxol (u otros taxanos, como docetaxel), Velban, Vincristina, VP-16, mientras que algunos fármacos más nuevos incluyen Gemcitabina (Gemzar), Herceptina, Irinotecán (Camptosar, CPT-11), Leustatina, Navelbina, Rituxan STI-571, Taxotere, Topotecán (Hycamtin), Xeloda (Capecitabina), Zevelina y calcitriol. Ejemplos no limitantes de inmunomoduladores que se pueden utilizar incluyen AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), bropirimina (Upjohn), interferón gamma (Genentech), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; Genetics Institute), IL-2 (Cetus o Hoffman-LaRoche), inmunoglobulina humana (Cutter Biological), IMREG (de Imreg de Nueva Orleans, La.), SK&F 106528 y TNF (factor de necrosis tumoral; Genentech). En algunas realizaciones, al sujeto se administra sorafenib.

El agente quimioterapéutico adicional puede ser un anticuerpo. Los anticuerpos pueden proporcionarse en forma liofilizada y rehidratarse con agua estéril antes de la administración, aunque también se proporcionan en soluciones estériles de concentración conocida. A continuación, la solución de anticuerpo se añade a una bolsa de infusión que contiene cloruro de sodio al 0,9 %, USP, y normalmente se administra a una dosis de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal. Se dispone de una experiencia considerable en la técnica en la administración de fármacos de anticuerpos, que se han comercializado en los EE. UU. desde la aprobación de RITUXAN® en 1997. El anticuerpo puede unirse específicamente al ligando de muerte programada (PD)-1 o al ligando de muerte programada (PD-L1) (véase más adelante). Los anticuerpos se pueden administrar mediante infusión lenta, en lugar de mediante una inyección intravenosa rápida o en bolo. En un ejemplo, se administra una dosis de carga más alta, con dosis de mantenimiento posteriores que se administran a un nivel más bajo. Por ejemplo, se puede infundir una dosis de carga inicial de 4 mg/kg durante un período de unos 90 minutos, seguida de dosis de mantenimiento semanales durante 4-8 semanas de 2 mg/kg infundidos durante un período de 30 minutos si la dosis anterior fue bien tolerada.

Regímenes de tratamiento también incluyen la combinación con cirugía, quimioterapia, radiación u otros agentes inmunoablativos tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación, vacuna peptídica, tal como la descrita en Izumoto *et al.* 2008 J Neurosurg 108:963-971. Agentes quimioterapéuticos ejemplares incluyen una antraciclina (por ejemplo, doxorubicina (por ejemplo, doxorubicina liposomal)), un alcaloide de la vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina), un agente alquilante (por ejemplo, ciclofosfamida, decarbazina, melfalán, ifosfamida, temozolomida), un anticuerpo de células inmunitarias (por ejemplo, alemtuzamab, gemtuzumab, rituximab, tositumomab), un antimetabolito (que incluye, por ejemplo, antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de la adenosina desaminasa (por ejemplo, fludarabina)), un inhibidor de mTOR, un agonista de la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides de TNFR (GITR), un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, aclacinomicina A, gliotoxina o bortezomib), un inmunomodulador tal como talidomida o un derivado de talidomida (por ejemplo, lenalidomida).

Agentes quimioterapéuticos generales considerados para su uso en terapias combinadas incluyen anastrozol (ARIMIDEX®), bicalutamida (CASODEX®), sulfato de bleomicina (BLENOXANE®), busulfán (MYLERAN®), inyección de busulfán (BUSULFEX®), capecitabina (XELODA®), N4-pentoxicarbonil-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (PARAPLATIN®), carmustina (BICNU®), clorambucilo (LEUKERAN®), cisplatino (PLATINOL®), cladribina (LEUSTATIN®), ciclofosfamida (CYTOXAN® o NEOSAR®), citarabina, arabinósido de citosina (CYTOSAR-U®), inyección de liposomas de citarabina (DEPOCYT®), dacarbazina (DTIC-DOME®), dactinomicina (Actinomicina D, Cosmegan), clorhidrato de daunorrubicina (CERUBIDINE®), inyección de liposomas de citrato de daunorrubicina (DAUNOXOME®), dexametasona, docetaxel (TAXOTERE®), clorhidrato de doxorubicina (ADRIAMYCIN®, RUBEX®), etopósido (VEPESID®), fosfato de fludarabina (FLUDARA®), 5-fluorouracilo (ADRUCIL®, EFUDEX®), flutamida (EULEXIN®), tezacitibina, gemcitabina (difluorodesoxicitidina), hidroxiurea (HYDREA®), idarubicina (IDAMYCIN®), ifosfamida (IFEX®), irinotecán (CAMPTOSAR®), L-asparaginasa (ELSPAR®), leucovorina cálcica, melfalán (ALKERAN®), 6-mercaptopurina (PURINETHOL®), metotrexato (FOLEX®), mitoxantrona (NOVANTRONE®), mylotarg, paclitaxel (TAXOL®), phoenix (Yttrium90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosan 20 con implante de carmustina (GLIADEL®), citrato de tamoxifeno (NOLVADEX®), tenipósido (VUMON®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (TIRAZONE®), clorhidrato de topotecán para inyección (HYCAMPTIN®), vinblastina (VELBAN®), vincristina (ONCOVIN®) y vinorelbina (NAVELBINE®). Agentes alquilantes ejemplares incluyen, sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo (AMINOURACIL MUSTARD®, CHLORETHAMINACIL®, DEMETHYLDOPOAN®, DESMETHYLDOPOAN®, HAEMANTHAMINE®, NORDOPAN®, URACIL NITROGEN MUSTARD®, URACILLOST®, URACILMOSTAZA®, URAMUSTIN®, URAMUSTINE®), clormetina (MUSTARGEN®), ciclofosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®, CLAFEN®, ENDOXAN®, PROCYTOX®, REVIMMUNE™), ifosfamida (MITOXANA®), melfalán (ALKERAN®), clorambucilo (LEUKERAN®), pipobroman (AMEDEL®, VERCYTE®), trietilenmelamina (HEMEL®, HEXYLEN®, HEXASTAT®), trietilenetiosforamina, temozolomida (TEMODAR®), tiotepa (THIOPLEX®), busulfán (BUSILVEX®, MYLERAN®), carmustina (BiCNU®), lomustina (CEENU®), estreptozocina (ZANOSAR®) y dacarbazina (DTIC-DOME®). Agentes

alquilantes ejemplares adicionales incluyen, de modo no taxativo, Oxaliplatin (ELOXATIN®);

Temozolomida (TEMODAR® y TEMODAL®); Dactinomicina (también conocida como actinomicina-D, COSMEGEN®); Melfalán (también conocido como L-PAM, L-sarcolisina y mostaza de fenilalanina, ALKERAN®); Altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), HEXYLEN®); Carmustina (BICNU®); Bendamustina (TREANDA®);

5 Busulfán (BUSULFEX® y MYLERAN®); Carboplatino (PARAPLATIN®); Lomustina (también conocida como CCNU, CEENU®); Cisplatino (también conocido como CDDP, PLATINOL® y PLATINOL®-AQ); Clorambucilo (LEUKERAN®); Ciclofosfamida (CYTOXAN® y NEOSAR®); Dacarbazine (también conocida como DTIC, DIC y carboxamida de imidazol, DTIC-DOME®); altretamina (también conocida como hexametilmelamina (HMM), HEXYLEN®); ifosfamida (IFEX®); prednunustina; procarbazina (MATULANE®); mecloretamina (también conocida como mostaza nitrogenada, mustina y clorhidrato de mecloroetamina, MUSTARGEN®); estreptozocina (ZANOSAR®); tiotepa (también conocida como tiofosfoamida, TESPA y TSPA, THIOPLEX®); ciclofosfamida (ENDOXAN®, CYTOXAN®, NEOSAR®, PROCYTOX®, REVIMMUNE®); y bendamustina HC1 (TREANDA®). Inhibidores de mTOR ejemplares incluyen, por ejemplo, temsirolimus; ridaforolimus (formalmente conocido como deferolimus, dimetilfosfonato de (1R,2R,4S)-4-[(2R)-

10 2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0^{4,9}]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669, y se describe en la publicación PCT n.º WO 03/064383); everolimus (AFINITOR® o RAD001); rapamicina (AY22989, SIROLIMUS®); simapimod (CAS164301-51-3); emsirolimus, (5-[2,4-Bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il]-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-Amino-8-[trans-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502, CAS 1013101-36-4); y N2-[1,4-dioxo-4-[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L-α-aspartilL-serina-, sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1), y XL765.

15 Inmunomoduladores ejemplares incluyen, por ejemplo, afutuzumab (disponible en ROCHE®); pegfilgrastim (NEULASTA®); lenalidomida (CC-5013, REVIMID®); talidomida (THALOMID®), actimida (CC4047); e IRX-2 (mezcla de citocinas humanas que incluyen interleucina 1, interleucina 2 e interferón γ, CAS 951209-71-5, disponible en IRX Therapeutics). Antraciclinas ejemplares incluyen, por ejemplo, doxorrubicina (Adriamycin® y RUBEX®); bleomicina (LENOXANE®); daunorrubicina (clorhidrato de daunorrubicina, daunomicina y clorhidrato de rubidomicina, CERUBIDINE®); daunorrubicina liposomal (liposoma de citrato de daunorrubicina, DAUNOXOME®); mitoxantrona (DHAD, NOVANTRONE®); epirubicina (ELLENCE™); idarrubicina (IDAMYCIN®,

IDAMYCIN PFS®); mitomicina C (MUTAMYCIN®); geldanamicina; herbimicina; ravidomicina; y desacetilravidomicina. Alcaloides de la vinca ejemplares incluyen, por ejemplo, tartrato de vinorelbina (NAVELBINE®), vincristina (ONCOVIN®) y vindesina (ELDISINE®)); vinblastina (también conocida como sulfato de vinblastina, vincaleucoblastina y VLB, ALKABAN-AQ® y VELBAN®); y vinorelbina (NAVELBINE®). Inhibidores del proteosoma ejemplares incluyen bortezomib (VELCADE®); carfilzomib (PX-171-007, (S)-4-Metil-N-((S)-I-((S)-4-metil-1-((R)-2-metiloxiran-2-il) -1-oxopentan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)-2-((S)-2-(2-morfolinooacetamido)-4-fenilbutanamido)-pentanamida);

20 marizomib (NPI-0052); citrato de ixazomib (MLN-9708); delanzomib (CEP-18770); y O-Metil-N-[(2-metil-5-tiazolil)carbonil]-L-seril-O-metil-N-[(1S)-2-[(2R)-2-metil-2-oxirani]-2-oxo-1-(fenilmetyl)etil]-L-serinamida (ONX-0912). Agonistas de GITR ejemplares incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de GITR y anticuerpos anti-GITR (por ejemplo, anticuerpos anti-GITR bivalentes) tales como, por ejemplo, una proteína de fusión de GITR descrita en la patente de EE. UU. n.º 6,111,090, patente europea n.º: 090505B1, patente de los EE. UU. n.º 8,586,023, publicaciones PCT n.º: WO 2010/003118 y 2011/090754, o un anticuerpo anti-GITR descrito, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. N.º 7,025,962, la patente europea N.º 1947183B1, la patente de los EE. UU. N.º 7,812,135, la patente de los EE. UU. N.º 8,388,967, la patente de los EE. UU. N.º 8,591,886, la patente europea N.º EP 1866339, Publicación PCT No. WO 2011/028683, Publicación PCT No. WO 2013/039954, Publicación PCT No. WO2005/007190, Publicación PCT No. WO 2007/133822, Publicación PCT No. WO2005/055808, Publicación PCT No. WO 1999/40196, Publicación PCT No. WO 2001/03720, Publicación PCT No. WO 1999/20758, Publicación PCT No. WO2006/083289, Publicación PCT No. WO 2005/115451, la patente de los EE. UU. n.º 7,618,632 y la publicación PCT n.º WO 2011/051726.

Procedimiento de expansión de células T CD39+CD103+CD8+

Células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se pueden expandir *in vitro*. En algunas realizaciones, las células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ aisladas de un sujeto pueden cultivarse en medio de cultivo tisular que comprende glutamina, suero y antibióticos para formar cultivos primarios. Las células en general se siembran en un recipiente de cultivo adecuado. Un recipiente de cultivo utilizado para cultivar la(s) célula(s) puede incluir, pero no se limita particularmente a: matraz, matraz para cultivo de tejidos, placa, placa de Petri, placa para cultivo de tejidos, placa múltiple, microplaca, placa de micropocillos, placa múltiple, placa de múltiples pocillos, microportaobjetos, portaobjetos de cámara, tubo, bandeja, cámaras

55 CELLSTACK®, bolsa de cultivo y botella giratoria, siempre que sea capaz de cultivar las células T en el mismo. Las células se pueden cultivar en un volumen de al menos o aproximadamente 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml, 550 ml, 600 ml, 800 ml, 1000 ml, 1500 ml, o cualquier intervalo derivable en este, dependiendo de las necesidades del cultivo. En algunas realizaciones, el recipiente de cultivo puede ser una placa de cultivo de tejidos, por ejemplo, una placa de 6 pocillos, 24 pocillos o 96 pocillos. En otras realizaciones, el recipiente de cultivo puede ser un biorreactor, que puede referirse a cualquier dispositivo o sistema *ex vivo* que soporte un entorno biológicamente activo de modo que las células puedan propagarse. El biorreactor puede tener un volumen de al menos o aproximadamente 2, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500 litros, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 metros cúbicos, o cualquier intervalo derivable en el mismo, se puede cultivar con los nutrientes necesarios para apoyar el crecimiento de la población de células.

En general, las células se cultivan en medios de crecimiento que incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y un tampón para mantener el pH. El medio también puede contener ácidos grasos o lípidos, aminoácidos (tales como aminoácidos no esenciales), vitaminas, factores de crecimiento, citocinas, sustancias antioxidantes, ácido pirúvico, agentes tampones y sales inorgánicas. Un medio de crecimiento ejemplar contiene un medio esencial mínimo, como el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) o el medio ESSENTIAL 8™ (E8™), complementado con diversos nutrientes, como aminoácidos no esenciales y vitaminas, para mejorar el crecimiento de las células T. Ejemplos de medios esenciales mínimos incluyen, entre otros, el medio Alpha de Minimal Essential Medium Eagle (MEM), el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), el medio 1640 de Roswell Park Memorial Institute (RPMI), el medio 199 y el medio F12. Opcionalmente, pueden añadirse antibióticos a un medio, tal como, pero sin limitación, penicilina, estreptomicina o tetraciclina. Glutamina también se puede agregar a un medio de cultivo de tejidos. En la técnica se conocen aditivos tales como antibióticos y aminoácidos.

Además, los medios esenciales mínimos pueden complementarse con aditivos adicionales tales como suero humano, de ternera fetal o bovino. El suero puede incluirse, por ejemplo, a una concentración de 10-15 % (volumen/volumen), tal como a alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 11 %, alrededor de 12 %, alrededor de 13 %, alrededor de 14 % o alrededor de 15 % de suero. El suero puede ser suero de ternera fetal. En otras realizaciones, el suero es suero humano, tal como suero AB humano.

Como alternativa, el medio puede estar libre de suero. En otros casos, el medio de crecimiento puede contener un reemplazo de suero. En la técnica se conocen reemplazos de suero ejemplares. Por ejemplo, el reemplazo de suero KNOCKOUT™ se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2002/0076747. Alternativas al suero pueden incluir materiales que contienen apropiadamente albúmina (tal como albúmina rica en lípidos, sustitutos de albúmina tales como albúmina recombinante, almidón vegetal, dextranos e hidrolizados de proteínas), transferrina (u otros transportadores de hierro), ácidos grasos, insulina, precursores de colágeno, oligoelementos, 2-mercptoetanol, 3'-tiolglicerol o equivalentes de los mismos. Las alternativas al suero se pueden preparar mediante el procedimiento descrito en la Publicación Internacional No. WO 98/30679, por ejemplo.

Un cultivo puede ser "libre de xeno (XF)", que se refiere a un medio o una condición de cultivo, que está esencialmente libre de componentes heterogéneos derivados de animales. Para cultivar células humanas, cualquier proteína de un animal no humano, tal como ratón, sería componentes xeno. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las condiciones descritas están libres de xeno. Por lo tanto, para cultivar células humanas, un cultivo que incluye suero AB humano puede estar "libre de xeno".

Se pueden definir adecuadamente otras condiciones de cultivo. Por ejemplo, la temperatura de cultivo puede ser de alrededor de 30 a 40 °C, por ejemplo, al menos o alrededor de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 °C, pero particularmente no se limita a ellos. En una realización, las células se cultivan a 37 °C. La concentración de CO₂ puede ser de aproximadamente 1 a 10 %, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a 5 %, o cualquier intervalo derivable de la misma. En un ejemplo no taxativo, se utiliza una concentración de CO₂ de alrededor de 5 %.

Los cultivos primarios se estimulan con una cantidad eficaz de células alimentadoras irradiadas alogénicas y una citocina, tal como interleucina (IL)-15 o IL-2, para formar células T estimuladas. Las células alimentadoras pueden ser, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica irradiadas alogénicas. Células alimentadoras, incluidas las células alimentadoras humanas, se pueden irradiar, como con 4000 rad de irradiación gamma.

En alguna realización, las células también se estimulan con un estimulador de células T policlonales, tal como fitohemaglutinina. En algunos ejemplos no limitantes, se utiliza una concentración de 1 µg/ml a 2 µg/ml. En realizaciones adicionales, se utilizan tanto una citocina, tal como IL-15 y/o IL-2, como PHA.

En algunas realizaciones, se usa una relación tal que se estimulan de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 2.000 células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ con de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 300.000 células alimentadoras alogénicas, tales como PBMC alogénicas irradiadas. En otras realizaciones, se usa una relación tal que se estimulan de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 2.000 células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ con aproximadamente 200.000 células alimentadoras alogénicas.

Se puede incluir una citocina, tal como IL-2 o IL-15 en el cultivo. En algunas realizaciones, la IL-15 puede usarse a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 15 ng/ml de IL-15. En algunas realizaciones, IL-15 se incluye en el cultivo a una concentración de aproximadamente 7 ng/ml a aproximadamente 12 ng/ml, tal como a una concentración de aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11 o aproximadamente 12 ng/ml. En un ejemplo no taxativo, IL-15 se incluye a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml.

Los cultivos de células T CD39+CD103 + CD8+ estimuladas se reponen con medio de cultivo tisular fresco y la citocina, tal como IL-15 y/o IL-2, a lo largo de la expansión in vitro. IL-15 puede incluirse en este medio de cultivo de tejidos a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml de IL-15, tal como aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml de IL-15. En algunas realizaciones, IL-15 se incluye en el cultivo a una concentración de aproximadamente 7 ng/ml a aproximadamente 12 ng/ml, tal como a una concentración de aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11 o

aproximadamente 12 ng/ml. En un ejemplo no taxativo, IL-15 se incluye a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml. En otros ejemplos, la IL-15 se incluye a una concentración de aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40 o aproximadamente 50 ng/ml.

El cultivo celular se puede mantener durante cualquier periodo. En algunas realizaciones, después de 15 a 30 días en cultivo, se cosechan las células T CD39+CD103+CD8+ expandidas.

Procedimientos de detección y tratamiento

En esta invención se describe que la administración de células T CD39+CD8+, tales como células T CD39+CD103+CD8, son de uso en el diagnóstico y tratamiento. En estas realizaciones, las células T CD39+CD103+CD8, se miden en una muestra biológica de un sujeto. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre periférica o una biopsia tumoral. El sujeto puede ser cualquier sujeto, tal como un ser humano o un sujeto veterinario. En realizaciones adicionales, el sujeto tiene un tumor, se sospecha que tiene un tumor o está en riesgo de tener un tumor. El tumor puede ser un tumor sólido. En algunos ejemplos no limitantes, el tumor sólido es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, glioblastoma o cáncer rectal.

En algunas realizaciones, se describen procedimientos para determinar si un sujeto con un tumor responderá a un inhibidor de puntos de control.

Estos procedimientos incluyen detectar la presencia de células T CD39+CD103+CD8, en una muestra biológica de un sujeto, donde la presencia de las células T CD39+CD103+CD8, en la muestra biológica indica que el inhibidor del punto de control será eficaz para tratar el tumor en el sujeto. El procedimiento también puede incluir administrar el inhibidor de puntos de control al sujeto. El inhibidor de punto de control puede ser, entre otros, un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1, un antagonista de CTLA-4, un antagonista de BTLA, un antagonista de TIM-3 o un antagonista de LAG3. Antagonistas adecuados se describen en detalle a continuación. Agonistas de 4-1BB adecuados también se describen a continuación.

En otras realizaciones, se describen procedimientos para determinar si un sujeto con un tumor responderá a un inhibidor de puntos de control, tal como un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1, un antagonista de CTLA-4, un antagonista de BTLA, un antagonista de TIM-3 o un antagonista de LAG3, o un agonista de 4-1BB. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen administrar a un sujeto una primera dosis del inhibidor de puntos de control, y determinar el número de células T CD39+CD103+CD8, en una muestra biológica de un sujeto. Un aumento en la cantidad de células T CD39+CD103+CD8, en la muestra biológica en comparación con un control indica que la primera dosis del inhibidor de punto de control es eficaz para tratar el tumor en el sujeto.

En realizaciones adicionales, se describen procedimientos para determinar si un sujeto con un tumor responderá a un inhibidor de puntos de control, tal como un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1, un antagonista de CTLA-4, un antagonista de BTLA, un antagonista de TIM-3 o un antagonista de LAG3, o un agonista de 4-1BB. Estos procedimientos incluyen administrar a un sujeto una primera dosis del inhibidor de puntos de control, y determinar el número de células T CD39+CD103+CD8, en una muestra biológica de un sujeto, donde un aumento en la cantidad de células T CD39+CD103+CD8, en la muestra biológica en comparación con un control indica que la primera dosis del inhibidor de puntos de control es eficaz para tratar el tumor en el sujeto. En realizaciones adicionales, los procedimientos incluyen además administrar una segunda dosis del inhibidor de puntos de control al sujeto, donde la primera dosis es la misma que la segunda dosis, o donde la segunda dosis es menor que la primera dosis.

En incluso otras realizaciones, se describen procedimientos para tratar a un sujeto con un tumor. Estos procedimientos incluyen administrar a un sujeto una primera dosis del inhibidor de puntos de control y determinar la cantidad de células T CD39+CD103+CD8, en una muestra biológica de un sujeto. Una disminución o ningún cambio en la cantidad de células T CD39+CD103+CD8, en la muestra biológica en comparación con un control indica que la primera dosis del inhibidor de punto de control no es eficaz para tratar el tumor en el sujeto. Se administra una segunda dosis del inhibidor de puntos de control al sujeto, donde la segunda dosis es mayor que la primera dosis, o donde la segunda dosis es la misma que la primera dosis.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un tumor, o está en riesgo de desarrollar un tumor, como se analizó anteriormente. Estos sujetos pueden identificarse mediante procedimientos estándar adecuados para un experto en la técnica, como un médico. Los procedimientos descritos incluyen seleccionar un sujeto de interés y administrar un inhibidor de puntos de control, tal como un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1, un antagonista de CTLA-4, un antagonista de BTLA, un antagonista de TIM-3 o un antagonista de LAG3. Al sujeto también se le puede administrar un agonista de 4-1BB.

En realizaciones adicionales, al sujeto se le administra una cantidad terapéuticamente efectiva de células T autólogas CD39+CD103+CD8, y una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de puntos de control, por ejemplo, un antagonista de PD-1, un antagonista de PD-L1, un antagonista de CTLA-4, un antagonista de BTLA, un antagonista de TIM-3 o un antagonista de LAG3. En realizaciones adicionales, al sujeto se le puede administrar un agonista de 4-1BB. La administración de las células T autólogas CD39+CD103+CD8 purificadas, y un inhibidor de punto de control

o un agonista de 4-1BB, como se describe en esta invención, aumentará la capacidad de un sujeto para superar afecciones patológicas, es decir, un tumor. Las células y el inhibidor de puntos de control se pueden incluir en una única composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. Por lo tanto, al purificar y generar una población purificada de células T CD39+CD103+CD8, de un sujeto *ex vivo* e introducir una cantidad terapéutica de estas células, se mejora la respuesta inmunitaria del sujeto receptor. La administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de puntos de control o un agonista de 4-1BB también mejora la respuesta inmune del receptor.

Los procedimientos también se pueden utilizar para evaluar la dosis de un inhibidor de puntos de control que es terapéuticamente eficaz para un sujeto. Por ejemplo, los procedimientos descritos en esta invención se pueden usar para determinar si la dosis administrada a un sujeto de interés se puede reducir y seguir siendo eficaz. Los procedimientos descritos en esta invención también se pueden usar para determinar si la dosis administrada a un sujeto es demasiado baja y, por lo tanto, se debe aumentar para que sea terapéuticamente eficaz.

Cualquiera de los procedimientos descritos puede incluir medir otros tipos de células, tales como células B y/o T. Los procedimientos descritos también pueden incluir medir la expresión de marcadores tales como PD-1, PD-L1, CTLA-4, BTLA, TIM-3 o LAG3. Se evalúa la expresión de CD8, CD39 y CD103.

En algunas realizaciones, se miden células T CD39+CD103+CD8. Un aumento en la cantidad de células T CD39+CD103+CD8, de la muestra biológica en comparación con un control indica que la dosis del inhibidor de punto de control es útil para tratar al sujeto, y donde la ausencia de una alteración significativa en la cantidad de células T CD39+CD103+CD8, en comparación con el control indica que la dosis del inhibidor de punto de control no es útil para tratar al sujeto. El control puede ser un valor estándar determinado previamente, o la cantidad de células T CD39+CD103+CD8, en una muestra del sujeto antes de la administración del inhibidor de punto de control, o la cantidad de células T CD39+CD103+CD8, en una muestra del sujeto, cuando al sujeto se le administra una sustancia de control.

En general, medir el número de células T CD39+CD103+CD8, incluye obtener una muestra que incluye células T de un sujeto, y determinar la presencia o número de células T CD39+CD103+CD8, en la muestra. En algunos ejemplos, la muestra es una muestra de biopsia, una muestra de sangre o una muestra de células mononucleares de sangre periférica. Los procedimientos incluyen inmunohistoquímica y/o citometría de flujo.

Los procedimientos pueden incluir procedimientos de inmunohistoquímica, tal como en una muestra biológica de un sujeto. La muestra puede ser una muestra tumoral. En algunas realizaciones, un anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno), tal como un anticuerpo que se une a CD8, CD39 o CD103 se marca directamente con un marcador detectable. En otra realización, el anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno) que se une a CD8, CD39 o CD103 (el primer anticuerpo) no está marcado y se utiliza un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al anticuerpo que se une al primer anticuerpo. Como es bien conocido por un experto en la técnica, se elige un segundo anticuerpo que sea capaz de unirse específicamente a la especie y clase específicas del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el primer anticuerpo es una IgG humana, a continuación el anticuerpo secundario puede ser un anti-IgG humana. Otras moléculas que pueden unirse a anticuerpos incluyen, de modo no taxativo, Proteína A y Proteína G, ambas disponibles comercialmente.

Marcadores adecuados para el anticuerpo o anticuerpo secundario se describen anteriormente e incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, agentes magnéticos y materiales radiactivos. Ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa. Ejemplos no limitantes de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina.

Ejemplos no limitantes de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelifera, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, díclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Un material luminiscente ejemplar no limitante es luminol; un agente magnético ejemplar no limitante es gadolinio, y los marcadores radiactivos ejemplares no limitantes incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S o ³H.

Células también se pueden cuantificar mediante citometría de flujo. En realizaciones adicionales, la muestra se puede purificar, por ejemplo, para separar células T, tales como células T CD8 o células T CD39+CD8+, tales como células T CD39+CD103+CD8. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen medir la cantidad de células T CD39+CD103+CD8. En algunos ejemplos, la cantidad de células T CD39+CD103+CD8, en una muestra biológica se compara con un control. Controles adecuados se mencionan anteriormente.

En algunos ejemplos, las suspensiones celulares se producen a partir de una muestra tumoral. En un ejemplo no limitante, en condiciones estériles, los tumores se cortan en trozos pequeños y se digieren en RPMI-1640 con hialuronidasa, colagenasa, ADNasa, así como albúmina sérica humana. Células se pueden digerir, por ejemplo, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación con una barra de agitación magnética. Las suspensiones de células se filtran a través de un filtro de células. Linfocitos infiltrantes de tumores se pueden enriquecer mediante centrifugación con una solución de gradiente de densidad.

Procedimientos para aislar, detectar y/o cuantificar células T son conocidos en la técnica, y en esta invención se proporcionan protocolos ejemplares. En la técnica también se conocen procedimientos para medir la proliferación de células T. Estos procedimientos en general implican el uso de técnicas moleculares y/o bioquímicas y no una simple observación visual. En algunos ejemplos, se utilizan células, análisis de células activadas por fluorescencia (FACS).

5 Se puede usar FACS para clasificar (aislar) células tales como células T tiñendo las células con un anticuerpo marcado adecuadamente. En una realización, se pueden usar varios anticuerpos (tales como anticuerpos que se unen a CD8, CD39 y CD103) y clasificación FACS para producir poblaciones sustancialmente purificadas de células T CD39+ CD103+ CD8. Se puede emplear cualquier técnica FACS, véase, por ejemplo, los procedimientos de FACS descritos en la patente de los EE. UU. n.º 5,061,620.

10 Sin embargo, se pueden emplear otras técnicas de diferente eficacia para purificar y aislar las poblaciones de células deseadas. Las técnicas de separación empleadas deben maximizar la retención de la viabilidad de la fracción de las células a recolectar. La técnica particular empleada, por supuesto, dependerá de la eficiencia de la separación, la citotoxicidad del procedimiento, la facilidad y la velocidad de la separación, y qué equipo y/o habilidad técnica se requiere.

15 Procedimientos de separación incluyen separación magnética, usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, agentes citotóxicos, ya sea unidos a un anticuerpo monoclonal o usados junto con complemento, y "cribado (panning)", que utiliza un anticuerpo monoclonal unido a una matriz sólida, u otra técnica conveniente. Anticuerpos unidos a perlas magnéticas y otras matrices sólidas, tales como perlas de agarosa, perlas de poliestireno, membranas de fibra hueca y placas de Petri de plástico, permiten la separación directa. Células que están unidas por el anticuerpo pueden 20 retirarse de la suspensión celular simplemente separando físicamente el soporte sólido de la suspensión celular. Las condiciones exactas y la duración de la incubación de las células con los anticuerpos unidos a la fase sólida dependerán de varios factores específicos del sistema empleado. Sin embargo, la selección de las condiciones apropiadas está bien dentro de la experiencia en la técnica.

25 Las células no unidas a continuación se pueden eluir o lavar con tampón fisiológico después de que se haya permitido el tiempo suficiente para que las células que expresan un marcador de interés (por ejemplo, CD39 o CD103) se unan a los anticuerpos unidos a fase sólida. Las células unidas se separan a continuación de la fase sólida mediante cualquier procedimiento apropiado, dependiendo principalmente de la naturaleza de la fase sólida y del anticuerpo empleado.

30 Anticuerpos se pueden conjugar con biotina, que a continuación se pueden eliminar con avidina o estreptavidina unida a un soporte, o fluorocromos, que se pueden usar, con FACS, para permitir la separación celular.

Por ejemplo, las células que expresan CD8 o CD3 se separan inicialmente de otras células por la expresión en la superficie celular de CD8 o CD3. A continuación, se comprueba la pureza de las células CD8+ o CD3+ aisladas, tal como con un citómetro de flujo BD LSRFORTESSA® (Becton Dickinson, San José, CA), si así se desea. En una realización, se realizan etapas de purificación adicionales, tales como clasificación por FACS de la población de 35 células. En un ejemplo, esta clasificación se puede realizar para detectar la expresión de CD39, CD103 y CD8.

40 Los procedimientos también pueden incluir medir la proliferación celular. En la técnica se conocen procedimientos para analizar la proliferación celular, tales como la evaluación de la proliferación. Por ejemplo, se pueden utilizar enfoques de dilución de colorantes de membrana que incluyen el marcaje químico *ex vivo* de células de interés con colorantes fluorescentes. Se puede utilizar el marcado con análogos de nucleósidos tritados (comúnmente ³H-timidina desoxirribonucleósido-³H-TdR) o bromodesoxiuridina (BrdU). El análisis FACS está disponible para la medición de la incorporación de BrdU. También se pueden usar marcadores sustitutos de proliferación, como el contenido de ADN y las proteínas asociadas al ciclo celular.

45 En un ejemplo, se puede utilizar la medición de Ki67 o PCNA. El antígeno Ki67 es la proteína nuclear prototípica relacionada con el ciclo celular que se expresa por las células en proliferación en todas las fases del ciclo celular activo (fase G1, S, G2 y M). Está ausente en las células en reposo (GO). Anticuerpos Ki67 son útiles para establecer la proliferación. Anticuerpos Ki67 se pueden usar para cuantificar células proliferantes entre células en reposo (índice Ki67). Ki67 se utiliza rutinariamente como un marcador del ciclo y la proliferación celular; los anticuerpos contra Ki67 están disponibles en el mercado, como en ABCAM®, y hay procedimientos disponibles para utilizar estos anticuerpos en análisis inmunohistoquímicos y FACS.

50 Se pueden usar otros procedimientos para detectar aquellas células que están en el ciclo celular activo en el momento del muestreo. La proliferación de linfocitos, tales como células T CD39+CD103+CD8, también se puede medir mediante el uso de procedimientos que utilizan isótopos estables para marcar el ADN en muestras biológicas que incluyen células. El ADN está uniforme y altamente marcado a través de la vía de síntesis *de novo*. Los marcadores de isótopos estables utilizados, por ejemplo, ²H-glucosa o agua pesada (²H₂O o H₂¹⁸O), no son tóxicas para animales y humanos, y en general son consideradas seguras por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (véase la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2009/0155179). La medición de la incorporación del marcador isotópico estable en el ADN linfocitario comprende las etapas siguientes: (i) extracción de ADN o su liberación de cromatina sin aislamiento adicional, hidrólisis de ADN a desoxirribonucleótidos, (ii) liberación selectiva de desoxirribosa a partir de desoxirribonucleótidos de purina, (iii) derivatización de purina desoxirribosa a un

derivado volátil (por ejemplo, tetraacetato de pentano, derivado de tetraacetilo de pentafluorobencílo u otro derivado adecuado) adecuado para el análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS), (iv) análisis de GC/MS de dicho derivado, (v) análisis del patrón de abundancia de isótopos de masa de dicho derivado, y (vi) cálculo a partir de dicho patrón de un valor de enriquecimiento en exceso que es una medida de la incorporación de isótopos estables. Se han enseñado realizaciones específicas de cada uno de estos procedimientos (véase la patente de EE. UU. N.º 5.910,40).

PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG3, antagonistas de BTLA y agonistas de 4-1BB

Inhibidores de puntos de control, tales como antagonistas de PD-1, antagonistas de PD-L1, antagonistas de CTLA-4, antagonistas de LAG3, antagonistas de TIM-3 y/o antagonistas de BTLA son útiles en el procedimiento descrito en esta invención, por ejemplo, en combinación con células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺. Agonistas de 4-1BB también son útiles en el procedimiento descrito en esta invención. El antagonista de PD-1, antagonista de PD-L1, antagonista de CTLA-4, antagonista de LAG3, antagonista de TIM-3, antagonista de BTLA y/o agonista de 4-1BB puede ser un compuesto químico o biológico. El agente puede ser un anticuerpo, que incluye, entre otros, un anticuerpo químérico, humanizado o humano. Antagonistas y agonistas adecuados también incluyen fragmentos de unión al antígeno de estos anticuerpos (ver arriba para una descripción de los fragmentos de unión al antígeno). El antagonista puede ser, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico inhibidor o una molécula pequeña, tal como una molécula de menos de 900 daltons o menos de 800 daltons.

Un antagonista de PD-1 puede ser cualquier compuesto químico o molécula biológica que bloquee la unión de PD-L1 o PD-L2 expresado en una célula a PD-1 humano expresado en una célula inmunitaria (célula T, célula B o célula NKT). Nombres o sinónimos alternativos para PD-1 y sus ligandos incluyen:

PDCD1, PD1, CD279 y SLEB2 para PD-1; PDCD1L1, PD-L1, B7H1, B7-4, CD274 y B7-H para PD-L1; y PDCD1L2, PDL2, B7-DC, Btdc y CD273 para PD-L2. Secuencias de aminoácidos de PD-1 humanas ejemplares se pueden encontrar en el N.º de acceso NCBI: NP 005009. Secuencias de aminoácidos de PD-L1 y PD-L2 humanas ejemplares se pueden encontrar en el N.º de acceso NCBI: NP 054862 y

NP 079515, respectivamente, 28 de abril de 2017. *In vivo*, PD-1 se expresa en células T activadas, células B,

y monocitos. En humanos, PD-1 es un receptor transmembrana tipo I de 50-55 kDa que se identificó originalmente en una línea de células T que sufre apoptosis inducida por activación. PD-1 se expresa en células T, células B y macrófagos. Los ligandos para PD-1 son los miembros de la familia B7 PD-ligando 1 (PD-L1, también conocido como B7-H1) y PD-L2 (también conocido como B7-DC). Se puede utilizar un inhibidor de PD-L1 o PD-L2 en los procedimientos descritos en esta invención.

Datos experimentales implican las interacciones de PD-1 con sus ligandos en la regulación negativa de las respuestas inmunitarias central y periférica. En particular, la proliferación en células T de tipo salvaje pero no en células T deficientes en PD-1 se inhibe en presencia de PD-L1. (Véase, por ejemplo, Ishida et al., EMBO J. 11:3887, 1992; Shinohara et al. Genomics 23:704, 1994; Pat. de EE. UU. N.º 5.698.520.

Secuencias de aminoácidos de PD-1 adicionales se describen en la patente de los EE. UU. n.º 6,808,710 y las publicaciones de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2004/0137577, 2003/0232323, 2003/0166531, 2003/0064380, 2003/0044768, 2003/0039653, 2002/0164600, 2002/0160000, 2002/0110836, 2002/0107363 y 2002/0106730.

PD-1 es un miembro de la familia de moléculas CD28/CTLA-4 según su capacidad para unirse a PD-L1. *In vivo*, al igual que CTLA-4, PD-1 se induce rápidamente en la superficie de las células T en respuesta a anti-CD3 (Agata et al. Int. Immunol. 8:765, 1996). El agotamiento de las células T es concomitante con una inducción en la expresión de PD-1, véase la publicación PCT N.º 2008/083174. La citotoxicidad de las células T se puede aumentar poniendo en contacto una célula T con un agente que reduce la expresión o actividad de PD-1. Un agente que reduce la expresión o actividad de PD-1 se puede usar para aumentar una respuesta inmunitaria, tal como a un tumor. Sin limitarse a la teoría, la reducción de la expresión o actividad de PD-1 da como resultado un aumento en la actividad de las células T citotóxicas, aumentando la respuesta inmune específica.

Los miembros de la familia PD-1 se unen a uno o más receptores, tales como PD-L1 y PD-L2 en células presentadoras de antígeno. Una secuencia de aminoácidos ejemplar para PD-L1 se proporciona como GENBANK® No. AAG18508 disponible el 4 de octubre de 2000. Se proporciona una secuencia de aminoácidos precursora de PD-L2 ejemplar como GENBANK® No. AAK15370 como disponible el 8 de abril de 2002. Una secuencia de aminoácidos precursora de PD-L2 variante ejemplar se proporciona como GENBANK® No. Q9BQ51 disponible el 12 de diciembre de 2006.

Antagonistas de uso en los procedimientos descritos en esta invención incluyen agentes que reducen la expresión o actividad de un ligando 1 de PD (PD-L1) o un ligando 2 de PD (PD-L2) o reducen la interacción entre PD-1 y PD-L1 o la interacción entre PD-1 y PD-L2; estos son antagonistas de PD. Ejemplos de compuestos incluyen anticuerpos (tales como un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-PD-L2), moléculas de ARNi (tales como moléculas de ARNi anti-PD-1, ARNi anti-PD-L1 y un ARNi anti-PD-L2), moléculas antisentido (tales como un ARN antisentido anti-PD-1, un ARN antisentido anti-PD-L1 y un ARN antisentido anti-PD-L2), proteínas negativas dominantes (tales como una proteína PD-1 negativa dominante, una proteína PD-L1 negativa dominante y una

proteína PD-L2 negativa dominante) e inhibidores de moléculas pequeñas. Cualquiera de estos antagonistas de PD-1 son útiles en los procedimientos descritos en esta invención.

Otros anticuerpos son útiles en los procedimientos descritos en esta invención (tales como un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-LAG3, un anticuerpo anti-TIM-3 o un anticuerpo anti-BTLA), moléculas de ARNi (tales como moléculas de ARNi anti-CTLA-4, ARNi anti-LAG3, ARNi anti-TIM-3 y un ARNi anti-BTLA), moléculas antisentido (tales como un ARN antisentido anti-CTLA-4, ARN antisentido anti-LAG3, ARN antisentido anti-TIM-3 y un ARN antisentido anti-BTLA). Proteínas negativas dominantes también de uso son una proteína CTLA-4 negativa dominante, una proteína LAG3 negativa dominante, una proteína LAG-3 negativa dominante y una proteína BTLA negativa dominante). Cualquiera de estos antagonistas es útil en los procedimientos descritos en esta invención. Además, los agonistas de 4-1BB, tales como anticuerpos que se unen a 4-1BB y aptámeros de ARN, son útiles en los procedimientos descritos en esta invención. También es útil una proteína negativa inhibidora o dominante del receptor de TGF-β.

Un antagonista es un agente que tiene la capacidad de reducir la expresión o la actividad de la diana en una célula. En algunas realizaciones, la expresión o actividad de PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, TIM-3, CTLA-4 o BTLA se reduce en al menos aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con dicha expresión o actividad en un control. Reducciones ejemplares en la actividad son al menos alrededor de 50 %, al menos alrededor de 60 %, al menos alrededor de 70 %, al menos alrededor de 80 %, al menos alrededor de 90 %, al menos alrededor de 95 %, o una ausencia completa de actividad detectable. En un ejemplo, el control es una célula que no se ha tratado con el antagonista de PD-1. En otro ejemplo, el control es un valor estándar, o una célula en contacto con un agente, tal como un portador, que se sabe que no afecta la actividad. La expresión o actividad se puede determinar mediante cualquier procedimiento estándar en la técnica. En un ejemplo no limitante, un antagonista de PD-1 inhibe o reduce la unión de PD-1 a PD-L1, PD-L2 o ambos. En un ejemplo no limitante, un antagonista de PD-L1 reduce la unión de PD-L1 o PD-1.

Un agonista es un agente que tiene la capacidad de aumentar la expresión o la actividad de la diana en una célula. En algunas realizaciones, la expresión o actividad de 4-1BB aumenta en al menos aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en comparación con dicha expresión o actividad en un control. Ejemplos de aumentos en la actividad son al menos alrededor del 50 %, al menos alrededor del 60 %, al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 %, o una ausencia completa de actividad detectable. En un ejemplo, el control es una célula que no se ha tratado con el agonista de 4-1BB. En otro ejemplo, el control es un valor estándar, o una célula en contacto con un agente, tal como un portador, que se sabe que no afecta la actividad. La expresión o actividad se puede determinar mediante cualquier procedimiento estándar en la técnica. En un ejemplo no taxativo, el agonista de 4-1BB estimula o aumenta la unión.

A. Anticuerpos

En algunas realizaciones, el antagonista es un anticuerpo. Se describen ejemplos de secuencias de aminoácidos de anticuerpos que se unen a PD-1, por ejemplo, en la publicación de patente de los EE. UU. n.º 2006/0210567. Anticuerpos que se unen a PD-1 también se describen en la publicación de patente de los EE. UU. n.º 2006/0034826. Anticuerpos que se unen a PD-1 también se describen en la patente de los EE. UU. n.º 7,488,802, la patente de los EE. UU. n.º 7,521,051, la patente de los EE. UU. n.º 8,008,449, la patente de los EE. UU. n.º 8,354,509, la patente de los EE. UU. n.º 8,168,757 y la publicación PCT de los EE. UU. n.º W02004/004771, publicación PCT n.º W02004/072286, publicación PCT n.º W02004/056875 y la solicitud de patente publicada de EE. UU. n.º 2011/0271358. El anticuerpo puede ser KEYTRUDA® (pembrolizumab). El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-PD-1 tal como Nivolumab (ONO-4538/BMS-936558) u OPDIVO® de Ono Pharmaceuticals. Antagonistas de unión a PD-L1 incluyen YW243.55.S70, MPDL3280A, MDX-1105 y MEDI 4736, véase la solicitud de patente publicada de EE. UU. n.º 2017/0044256. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a PD-L1 humano y son útiles en los procedimientos y composiciones descritos se describen en la publicación PCT n.º WO2013/019906, Publicación PCT No. WO2010/077634 A1 y Patente de EE. UU. N.º 8,383,796. Los anticuerpos inhibidores de puntos de control contra PD-1 (por ejemplo, Nivolumab, pidilizumab y Pembrolizumab) o PD-L1 (por ejemplo, Durvalumab, Atezolizumab y Avelumab) son de uso en cualquiera de los procedimientos descritos en esta invención. Anticuerpos que se unen a PD-1, PD-L2 y PD-1 también se describen en la patente n.º 8,552,154. En varios ejemplos, el anticuerpo se une específicamente a CTLA-4, BTLA, PD-1, PD-L1 o PD-L2 con una constante de afinidad de al menos 10^7 M^{-1} , tal como al menos 10^8 M^{-1} al menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ o al menos 10^9 M^{-1} . Cualquiera de estos anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno, son útiles en los procedimientos descritos en esta invención.

Ejemplos de anticuerpos que se unen específicamente a CTLA-4 se describen en la publicación PCT N.º WO 2001/014424, publicación PCT No. WO 2004/035607, publicación de los EE. UU. N.º 2005/0201994, patente europea N.º EPI 141028, y la patente europea No. EP 1212422 B1. Se describen anticuerpos CTLA-4 adicionales en la patente de EE. UU. n.º 5,811,097, patente de EE. UU. n.º 5,855,887, patente de EE. UU. n.º 6,051,227, patente de EE. UU. n.º 6,984,720, patente de EE. UU. n.º 6,682,736, patente de EE. UU. n.º 6,207,156, patente de EE. UU. n.º 5,977,318, patente de EE. UU. n.º 6,682,736, patente de EE. UU. n.º 7,109,003, patente de EE. UU. n.º 7,132,281, patente de EE. UU. n.º 7,452,535 y patente de EE. UU. n.º 7,605,238; publicación PCT n.º WO 01/14424, publicación PCT n.º WO 00/37504, publicación PCT n.º WO 98/42752, solicitud de patente publicada de EE. UU. n.º 2000/037504, solicitud publicada de EE. UU. n.º 2002/0039581 y solicitud publicada de EE. UU. n.º 2002/086014. Anticuerpos que se unen específicamente a CTLA-4 también se describen en Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 95(17): 10067-10071

(1998); Camacho et al., J. Clin. Oncol., 22(145): Resumen No. 2505 (2004) (anticuerpo CP-675206); Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998). En algunas realizaciones, el antagonista de CTLA-4 es Ipilimumab (también conocido como MDX-010 y MDX-101 y YERVOY®), véase la publicación PCT N.º WO 2001/014424. Estos anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno, son útiles en los procedimientos descritos en esta invención.

5 En realizaciones adicionales, se utiliza un antagonista de BTLA en los procedimientos descritos en esta invención. Anticuerpos que se unen específicamente a BTLA se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente publicada de EE. UU. n.º 2016/0222114, la solicitud de patente publicada de EE. UU. n.º 2015/0147344 y la solicitud de patente publicada de EE. UU. n.º 2012/0288500. Agentes biológicos que modulan la actividad de BTLA, específicamente utilizando complejos cis mediadores de entrada de herpesvirus (HVEM) se describen en la solicitud de patente publicada de los EE. UU. n.º 2014/0220051 y la solicitud de patente publicada de los EE. UU. n.º 2010/0104559. En otras realizaciones más, el anticuerpo se une específicamente a TIM-3, tal como TSR-022. En realizaciones adicionales, el anticuerpo se une específicamente a LAG3, tal como BMS-986016, GSK2831781 o los anticuerpos descritos en la publicación PCT N.º WO2015042246 A1. Véase también el ensayo clínico número NCT01968109 para "Safety Study of Anti-LAG-3 With and Without Anti-PD-1 in the Treatment of Solid Tumors (Estudio de seguridad de Anti-LAG-3 con y sin Anti-PD-1 en el tratamiento de tumores sólidos)" disponible en Internet en clinicaltrials.gov. Estos anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno, son útiles en los procedimientos descritos en esta invención.

También se utiliza un anticuerpo agonista 4-1BB. Se describen anticuerpos adecuados, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 8,337,850 y la publicación PCT n.º WO 2015179236 A1. Anticuerpos de uso en cualquiera de los procedimientos descritos incluyen urelumab (BMS-663513) y PF-05082566 (Pfizer).

20 Los anticuerpos de uso en los procedimientos descritos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos desinmunizados (tales como para reducir una respuesta humana anti-ratón), anticuerpos químéricos y proteínas de fusión de inmunoglobulina (Ig). Fragmentos de unión al antígeno de estos anticuerpos también son útiles en los procedimientos descritos en esta invención. Un experto en la técnica puede preparar anticuerpos polyclonales, tal como inmunizando a un sujeto adecuado (tal como un sujeto veterinario) con un inmunógeno. La titulación de anticuerpos en el sujeto inmunizado puede controlarse a lo largo del tiempo mediante técnicas estándar, tal como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando antígeno inmovilizado. En un ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 (o combinaciones de estos) se puede aislar del mamífero (tal como del suero) y purificarse adicionalmente mediante técnicas conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden purificar usando cromatografía de proteína A para aislar anticuerpos IgG.

30 Células productoras de anticuerpos se pueden obtener del sujeto y se pueden utilizar para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar (véase Kohler y Milstein Nature 256:495 49, 1995; Brown et al., J. Immunol. 127:539 46, 1981; Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 96, 1985; Gefter, M. L. et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231 36; Kenneth, R. H. en Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses. Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York (1980); Kozbor et al. Inmunol. Today 4:72, 1983; Lerner, E. A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54:387 402; Yeh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76:2927 31, 1976). En un ejemplo, una línea celular inmortal (típicamente un mieloma) se fusiona a linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, LAG3, BTLA o CTLA-4 y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se seleccionan para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido de interés.

40 En una realización, para producir un hibridoma, una línea celular inmortal (tal como una línea celular de mieloma) se deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, hibridomas murinos pueden fabricarse fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con un péptido CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB con una línea celular de ratón inmortalizada. En un ejemplo, se utiliza una línea celular de mieloma de ratón que es sensible al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Se puede usar cualquiera de una cantidad de líneas celulares de mieloma como compañero de fusión según técnicas estándar, que incluyen, por ejemplo, líneas de mieloma P3- NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14, que están disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Md. Células de mieloma de ratón sensibles a HAT se pueden fusionar a esplenocitos de ratón usando polietilenglicol ("PEG"). Células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan a continuación utilizando medio HAT, que mata las células de mieloma no fusionadas (y fusionadas improductivamente). Células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de interés se pueden detectar, por ejemplo, mediante el cribado de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma para los anticuerpos de producción que se unen a una molécula PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG3, BTLA, CTLA-4, PD-L2 o 4-1BB, tal como mediante el uso de un ensayo inmunológico (tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)).

55 Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, se puede identificar y aislar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB mediante el cribado de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatorias recombinantes (tal como una biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos) con CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB para aislar miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen específicamente al polipéptido. Kits para generar y seleccionar bibliotecas de presentación de fagos están disponibles comercialmente (tales como, pero sin limitarse a, Pharmacia y Stratagene). Ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente susceptibles de uso en la

generación y detección de la biblioteca de presentación de anticuerpos se pueden encontrar, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. N.º 5,223,409; publicación PCT N.º WO 90/02809; Publicación PCT No. WO 91/17271; Publicación PCT No. WO 92/18619; Publicación PCT WO 92/20791; Publicación PCT No. WO 92/15679; Publicación PCT No. WO 92/01047; Publicación PCT WO 93/01288; Publicación PCT No. WO 92/09690; Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 88:7978 7982, 1991; Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res. 19:4133 4137, 1991.

En un ejemplo, se determina la secuencia de las regiones determinantes de especificidad de cada CDR. Residuos que están fuera de los SDR (sitios de contacto sin ligandos) son sustituidos. Por ejemplo, en cualquiera de las secuencias de CDR como en la tabla anterior, se pueden sustituir como máximo uno, dos o tres aminoácidos. En la técnica se conoce bien la producción de anticuerpos quiméricos, que incluyen una región de estructura de un anticuerpo y las CDR de un anticuerpo diferente. Por ejemplo, anticuerpos humanizados se pueden producir de forma rutinaria. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser una inmunoglobulina humanizada que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal donante que se une a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB e inmunoglobulina y estructuras de región variable de cadena pesada y ligera de estructuras de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina aceptora humana. Anticuerpos monoclonales humanizados se pueden producir mediante la transferencia de regiones determinantes de complementariedad (CDR) del donante a partir de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón donante (tal como un anticuerpo específico CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB) en un dominio variable humano, y a continuación sustituir los residuos humanos en las regiones de estructura cuando sea necesario para retener la afinidad. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los problemas potenciales asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes del anticuerpo donante. Técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados se describen, por ejemplo, en Jones et al., *Nature* 321:522, 1986; Riechmann et al., *Nature* 332:323, 1988; Verhoeven et al., *Science* 239:1534, 1988; Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285, 1992; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992; y Singer et al., *J. Immunol.* 150:2844, 1993. El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo, pero en varias realizaciones el anticuerpo es una IgG, que incluye, pero no se limita a, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina humanizada se une específicamente al antígeno de interés (por ejemplo, CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB) con una constante de afinidad de al menos 10^7 M^{-1} , tal como al menos 10^8 M^{-1} al menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ o al menos 10^9 M^{-1} .

En una realización, la secuencia de la estructura de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina humanizada puede ser al menos aproximadamente 65 % idéntica a la secuencia de la estructura de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina donante. Por lo tanto, la secuencia de la estructura de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina humanizada puede ser al menos alrededor de 75 %, al menos alrededor de 85 %, al menos alrededor de 99 % o al menos alrededor de 95 %, idéntica a la secuencia de la estructura de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina donante. Regiones de estructura humanas y mutaciones que se pueden realizar en regiones de estructura de anticuerpo humanizado se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 5,585,089).

Anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos químéricos y anticuerpos humanizados, incluyen moléculas de longitud completa, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')2 y Fv que incluyen una región variable de cadena pesada y cadena ligera y son capaces de unirse a determinantes de epítopo específicos. Estos fragmentos de anticuerpo conservan cierta capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o receptor. Estos fragmentos incluyen:

- (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión al antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse mediante digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para proporcionar una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;
- (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;
- (3) (Fab')2, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')2 es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos por dos enlaces disulfuro;
- (4) Fv, un fragmento modificado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y
- (5) Anticuerpo monocatenario (tal como scFv), definido como una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unida por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

En la técnica se conocen procedimientos para preparar estos fragmentos de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988). En varios ejemplos, la región variable incluye la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como polipéptidos individuales. Anticuerpos Fv son típicamente de aproximadamente 25 kDa y contienen un sitio de unión al antígeno completo con tres CDR por cada cadena pesada y cada cadena ligera. Para producir

estos anticuerpos, el V_H y el V_L pueden expresarse a partir de dos construcciones de ácido nucleico individuales en una célula huésped. Si el V_H y el V_L se expresan de forma no contigua, las cadenas del anticuerpo Fv se mantienen típicamente unidas por interacciones no covalentes. Sin embargo, estas cadenas tienden a disociarse tras la dilución, por lo que se han desarrollado procedimientos para reticular las cadenas a través de glutaraldehído, disulfuros intermoleculares o un enlazador peptídico. Por lo tanto, en un ejemplo, el Fv puede ser un Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera están unidas químicamente por enlaces disulfuro.

En un ejemplo adicional, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión al antígeno de cadena simple (scFv) se preparan mediante la construcción de un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huéspedes recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. En la técnica se conocen procedimientos para producir scFv (véase Whitlow *et al.*, *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, página 97, 1991; Bird *et al.*, *Science* 242:423, 1988; patente de los EE. UU. n.º 4,946,778; Pack *et al.*, *Bio/Technology* 11:1271, 1993; y Sandhu, *supra*).

Fragmentos de anticuerpo se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en *E. coli* de ADN que codifica el fragmento. Fragmentos de anticuerpos se pueden obtener mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')2. Este fragmento se puede escindir adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes 3,5S Fab'. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente (véase la patente de EE. UU. n.º 4,036,945 y la patente de EE. UU. n.º 4,331,647, y las referencias contenidas en las mismas; Nisonhoff *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959; Edelman *et al.*, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, pág. 422, Academic Press, 1967; y Coligan *et al.* En las secciones 2.8.1-2.8.10 y 2.10.1-2.10.4).

También se pueden usar otros procedimientos de escisión de anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Un experto se dará cuenta de que se pueden producir variantes conservadoras de los anticuerpos. Dichas variantes conservadoras empleadas en fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos dsFv o en fragmentos scFv, retendrán los residuos de aminoácidos necesarios para el plegamiento y la estabilización correctos entre las regiones V_H y V_L , y retendrán las características de carga de los residuos para preservar el bajo pI y la baja toxicidad de las moléculas. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos (como máximo una, como máximo dos, como máximo tres, como máximo cuatro o como máximo cinco sustituciones de aminoácidos) en las regiones V_H y V_L para aumentar el rendimiento. Por lo tanto, un experto en la técnica puede revisar fácilmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de interés, localizar uno o más de los aminoácidos en la breve tabla anterior, identificar una sustitución conservadora y producir la variante conservadora utilizando técnicas moleculares bien conocidas.

Moléculas efectoras, tales como restos terapéuticos, de diagnóstico o de detección, se pueden unir a un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB utilizando cualquier número de medios conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden usar medios de unión covalentes y no covalentes. El procedimiento para unir una molécula efectora a un anticuerpo varía según la estructura química del efector. Polipéptidos típicamente contienen una variedad de grupos funcionales; tales como grupos ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo para dar como resultado la unión de la molécula efectora. De manera alternativa, el anticuerpo se derivatiza para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas enlazadoras tales como las disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL. El enlazador puede ser cualquier molécula utilizada para unir el anticuerpo a la molécula efectora. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo como con la molécula efectora. Enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo y la molécula efectora son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (tal como a través de un enlace disulfuro a cisteína) o a los grupos amino y carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

Secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos pueden prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado que incluye, por ejemplo, clonación de secuencias apropiadas o mediante síntesis química directa mediante procedimientos tales como el procedimiento de fosfotriéster de Narang *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:90-99, 1979; el procedimiento de fosfodiéster de Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:109-151, 1979; el procedimiento de dietilfosforamidita de Beaucage *et al.*, *Tetra. Lett.* 22:1859-1862, 1981; el procedimiento de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage & Caruthers, *Tetra. Letts.*

22(20): 1859-1862, 1981, por ejemplo, usando un sintetizador automatizado como se describe en, por ejemplo, Needham-VanDevanter *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 12:6159-6168, 1984; y, el procedimiento de soporte sólido de la patente de EE. UU. N.º 4,458,066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este se puede convertir en ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena simple como plantilla. Un experto reconocería que, si bien la síntesis química de ADN en general se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

Ácidos nucleicos ejemplares que codifican secuencias que codifican un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB se pueden preparar mediante técnicas de clonación.

Ejemplos de técnicas de clonación y secuenciación apropiadas, e instrucciones suficientes para dirigir a las personas expertas a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Sambrook *et al.*, *supra*, Berger y Kimmel (eds.), *supra*, y Ausubel, *supra*. La información del producto de los fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información útil. Dichos fabricantes incluyen SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO), R&D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia Amersham (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen (San Diego, CA) y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas por un experto.

Ácidos nucleicos también se pueden preparar mediante procedimientos de amplificación. Procedimientos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (tas), el sistema de replicación de secuencias autosostenido (3 SR). Una amplia variedad de procedimientos de clonación, células huésped y metodologías de amplificación *in vitro* son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En un ejemplo, un anticuerpo de uso se prepara insertando el ADNc que codifica una región variable de un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB en un vector que comprende el ADNc que codifica una molécula efectora (EM). La inserción se realiza de modo que la región variable y la EM se lean en estructura para que se produzca un polipéptido continuo. Por lo tanto, el polipéptido codificado contiene una región Fv funcional y una región EM funcional. En una realización, el ADNc que codifica un marcador detectable (tal como una enzima) se liga a un scFv de modo que el marcador se ubique en el extremo carboxilo del scFv. En otro ejemplo, un marcador detectable se encuentra en el extremo amino del scFv. En un ejemplo adicional, el ADNc que codifica un marcador detectable se liga a una región variable de cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB de modo que el marcador se ubica en el extremo carboxilo de la región variable de cadena pesada. La región variable de cadena pesada puede ligarse posteriormente a una región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB usando enlaces disulfuro. En otro ejemplo más, el ADNc que codifica un marcador se liga a una región variable de cadena ligera de un anticuerpo que se une a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB, de modo que el marcador se encuentra en el extremo carboxilo de la región variable de cadena ligera. La región variable de cadena ligera puede ligarse posteriormente a una región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB usando enlaces disulfuro.

Una vez que los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo o fragmento funcional del mismo se aislan y clonian, la proteína se puede expresar en una célula modificada genéticamente de forma recombinante tal como células de bacterias, plantas, levaduras, insectos y mamíferos. Una o más secuencias de ADN que codifican el anticuerpo o fragmento funcional del mismo se pueden expresar *in vitro* mediante transferencia de ADN a una célula huésped adecuada. La célula puede ser procariota o eucariota. El término también incluye cualquier progenie de la célula huésped en cuestión. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica a la célula parental ya que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. En la técnica se conocen procedimientos de transferencia estable, lo que significa que el ADN extraño se mantiene continuamente en el huésped.

Secuencias de polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento funcional del mismo se pueden unir operativamente a secuencias de control de la expresión. Una secuencia de control de expresión unida operativamente a una secuencia codificante se liga de modo que la expresión de la secuencia codificante se logre en condiciones compatibles con las secuencias de control de expresión. Las secuencias de control de la expresión incluyen, entre otros, promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción adecuados, un codón de inicio (es decir, ATG) frente a un gen que codifica una proteína, una señal de corte y empalme para los intrones, el mantenimiento de la estructura de lectura correcta de ese gen para permitir la traducción adecuada del ARNm y los codones de parada.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican el anticuerpo o fragmento funcional del mismo se pueden insertar en un vector de expresión que incluye, entre otros, un plásmido, virus u otro vehículo que se puede manipular para permitir la inserción o incorporación de secuencias y se puede expresar en procariotas o eucariotas. Huéspedes pueden incluir organismos microbianos, de levadura, de insectos y de mamíferos. En la técnica se conocen bien procedimientos para expresar secuencias de ADN que tienen secuencias eucariotas o virales en procariotas. En la técnica se conocen vectores de ADN vírico y plasmídico biológicamente funcionales capaces de expresión y replicación en un huésped.

La transformación de una célula huésped con ADN recombinante puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales que son bien conocidas por los expertos en la técnica. Cuando el huésped es procariota, tal como *E. coli*, se pueden preparar células competentes que son capaces de captación de ADN a partir de células cosechadas después de la fase de crecimiento exponencial y posteriormente tratadas mediante el procedimiento de CaCl₂ usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, se puede usar MgCl₂ o RbCl. La transformación también se puede realizar después de formar un protoplasto de la célula huésped, si se desea, o mediante electroporación.

Cuando el huésped es un eucariota, se pueden usar procedimientos de transfección de ADN tales como coprecipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas o vectores de virus. Células eucariotas también se pueden cotransformar con secuencias de polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento funcional del mismo y una segunda molécula de ADN extraño que codifica un fenotipo seleccionable, tal como el gen de la timidina cinasa del herpes simple. Otro procedimiento es utilizar un vector viral eucariota, tal como el virus de simio 40 (SV40) o el virus de papiloma bovino, para infectar o transformar transitoriamente células eucariotas y expresar la proteína (véase, por ejemplo, *Eukaryotic Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982). Un experto en la técnica puede usar fácilmente sistemas de expresión tales como plásmidos y vectores de uso en la producción de proteínas en células que incluyen células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y de mieloma.

El aislamiento y la purificación del polipéptido expresado de forma recombinante se pueden llevar a cabo mediante medios convencionales que incluyen cromatografía preparativa y separaciones inmunológicas. Una vez expresados, los anticuerpos recombinantes pueden purificarse según procedimientos estándar de la técnica, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna y similares (véase, en general, R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y., 1982). En esta invención se describen composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95 % de homogeneidad, y se puede usar 98 a 99 % o más de homogeneidad para fines farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se deseé, si se van a usar terapéuticamente, los polipéptidos deben estar sustancialmente libres de endotoxina.

Se han descrito procedimientos para la expresión de anticuerpos monocatenarios y/o el replegamiento a una forma activa adecuada, que incluyen anticuerpos monocatenarios, de bacterias tales como *E. coli* y son bien conocidos y aplicables a los anticuerpos descritos en esta invención. Véase, Buchner et al., *Anal. Biochem.* 205:263-270, 1992; Pluckthun, *Biotechnology* 9:545, 1991; Huse et al., *Science* 246:1275, 1989 y Ward et al., *Nature* 341:544, 1989.

A menudo, las proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otras bacterias se aislan de los cuerpos de inclusión y requieren solubilización utilizando desnaturizantes fuertes y un replegamiento posterior. Durante la etapa de solubilización, como es bien conocido en la técnica, debe estar presente un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un tampón ejemplar con un agente reductor es: 0,1 M Tris pH 8,6 M guanidina, 2 mM EDTA, 0,3 M DTE (ditioeritritol). La reoxidación de los enlaces disulfuro puede ocurrir en presencia de reactivos de tiol de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, como se describe en Saxena et al., *Biochemistry* 9: 5015-5021, 1970, y especialmente como se describe por Buchner et al., *supra*.

La renaturalización se logra típicamente por dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturizada y reducida en tampón de replegamiento. Un tampón ejemplar es Tris 0,1 M, pH 8,0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado 8 mM (GSSG) y EDTA 2 mM.

Como modificación del protocolo de purificación de anticuerpos de dos cadenas, las regiones de cadena pesada y ligera se solubilizan y reducen por separado y a continuación se combinan en la solución de replegamiento. Se obtiene un rendimiento ejemplar cuando estas dos proteínas se mezclan en una relación molar tal que no se exceda un exceso molar de 5 veces de una proteína sobre la otra. Es deseable añadir glutatión oxidado en exceso u otros compuestos oxidantes de bajo peso molecular a la solución de replegamiento después de que se complete la mezcla (*shuffling*) redox.

Además de los procedimientos recombinantes, los anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos que se describen en esta invención también se pueden construir en su totalidad o en parte utilizando la síntesis de péptidos estándar. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud se puede lograr uniendo el aminoácido C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Técnicas para la síntesis en fase sólida se describen en Barany & Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A*. pp. 3-284; Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156, 1963, y Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2^a ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 1984. Las proteínas de mayor longitud se pueden sintetizar mediante condensación de los extremos amino y carboxilo de fragmentos más cortos. En la técnica se conocen bien procedimientos para formar enlaces peptídicos mediante la activación de un extremo carboxilo terminal (tal como mediante el uso del reactivo de acoplamiento N, N'-díciclohexilcarbodimida).

B. Ácidos nucleicos inhibidores

Ácidos nucleicos inhibidores que disminuyen la expresión y/o actividad de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 también se pueden usar en los procedimientos descritos en esta invención. Una realización es un ARN inhibidor pequeño (ARNip) para la interferencia o inhibición de la expresión de un gen diana. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican PD-1, PD-L1 y PD-L2 se describen en los números de acceso de GENBANK® NM_005018, AF344424, NP_079515 y NP_054862.

En general, los ARNip se generan mediante la escisión de moléculas de ARN bicatenario relativamente largas mediante enzimas Dicer o DCL (Zamore, *Science*, 296:1265-1269, 2002; Bernstein *et al.*, *Nature*, 409:363-366, 2001). En animales y plantas, los ARNip se ensamblan en RISC y guían la actividad ribonucleolítica específica de secuencia de RISC, dando como resultado de ese modo la escisión de ARNm u otras moléculas diana de ARN en el citoplasma. En el núcleo, los ARNip también guían la histona asociada a la heterocromatina y la metilación del ADN, lo que resulta en el silenciamiento transcripcional de genes individuales o grandes dominios de cromatina. Los ARNip de PD-1 están disponibles en el mercado, tal como en Santa Cruz Biotechnology, Inc.

La presente descripción proporciona ARN adecuado para la interferencia o inhibición de la expresión de un gen diana, ARN que incluye ARN bicatenario de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos que contiene un saliente 3' y/o 5' de 0 a 5 nucleótidos en cada cadena. La secuencia del ARN es sustancialmente idéntica a una porción de un ARNm o transcripto de un gen diana, tal como CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2, para el que se desea la interferencia o inhibición de la expresión. Para los fines de la presente descripción, una secuencia del ARN "sustancialmente idéntica" a una porción específica del ARNm o transcripción del gen diana para la cual se desea la interferencia o inhibición de la expresión difiere en no más de aproximadamente 30 por ciento, y en algunas realizaciones no más de aproximadamente 10 por ciento, de la porción específica del ARNm o transcripción del gen diana. En realizaciones particulares, la secuencia del ARN es exactamente idéntica a una porción específica del ARNm o transcripto del gen diana.

Por lo tanto, los ARNip descritos en esta invención incluyen ARN bicatenario de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud y un saliente 3' o 5' que tiene una longitud de 0 a 5 nucleótidos en cada cadena, donde la secuencia del ARN bicatenario es sustancialmente idéntica a (véase anteriormente) una porción de un ARNm o transcripto de un ácido nucleico que codifica CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2. En ejemplos particulares, el ARN bicatenario contiene de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos, por ejemplo, 20, 21 o 22 nucleótidos sustancialmente idénticos a un ácido nucleico que codifica CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2. En ejemplos adicionales, el ARN bicatenario contiene de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos 100 % idénticos a un ácido nucleico que codifica CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2. No debe ser que en este contexto "aproximadamente" se refiera solo a cantidades enteras. En un ejemplo, "aproximadamente" 20 nucleótidos se refiere a un nucleótido de 19 a 21 nucleótidos de longitud.

Con respecto al saliente en el ARN bicatenario, la longitud del saliente es independiente entre las dos cadenas, ya que la longitud de un saliente no depende de la longitud del saliente en la otra cadena. En ejemplos específicos, la longitud del saliente 3' o 5' es de 0 nucleótidos en al menos una cadena y, en algunos casos, es de 0 nucleótidos en ambas cadenas (por lo tanto, un ARNb romo). En otros ejemplos, la longitud del saliente 3' o 5' es de 1 nucleótido a 5 nucleótidos en al menos una cadena. Más particularmente, en algunos ejemplos, la longitud del saliente 3' o 5' es de 2 nucleótidos en al menos una cadena, o 2 nucleótidos en ambas cadenas. En ejemplos particulares, la molécula de ARNcd tiene salientes 3'de 2-nucleótidos en ambas cadenas.

Por tanto, en una realización de ARN proporcionada particular, el ARN bicatenario contiene 20, 21 o 22 nucleótidos, y la longitud del saliente 3' es de 2 nucleótidos en ambas cadenas. En realizaciones de los ARN proporcionados en esta invención, el ARN bicatenario contiene aproximadamente 40-60 % de adenina+uracilo (AU) y aproximadamente 60-40 % de guanina+citosina (GC). Más particularmente, en ejemplos específicos, el ARN bicatenario contiene alrededor de 50 % de AU y alrededor de 50 % de GC.

También se describen en esta invención ARN que incluyen además al menos un ribonucleótido modificado, por ejemplo, en la cadena sentido del ARN bicatenario. En ejemplos particulares, el ribonucleótido modificado está en el saliente 3' de al menos una cadena, o más particularmente en el saliente 3' de la cadena sentido. Se contempla particularmente que los ejemplos de ribonucleótidos modificados incluyen ribonucleótidos que incluyen un marcador detectable (por ejemplo, un fluoróforo, tal como rodamina o FITC), un análogo de nucleótido de tiofósfato, un desoxinucleótido (considerado modificado porque la molécula base es ácido ribonucleico), un 2'-fluorouracilo, un 2' -aminouracilo, una 2'-aminocitidina, un 4-tiouracilo, un 5-bromouracilo, un 5-yodouracilo, un 5-(3-aminoalil)-uracilo, una inosina o un análogo de nucleótido 2' O-Me-.

Las moléculas antisentido y de ribozima para CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 también son útiles en el procedimiento descrito en esta invención. Ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias a al menos una porción de una molécula de ARNm específica (Weintraub, *Scientific American* 262:40, 1990). En la célula, los ácidos nucleicos antisentido se hibridan con el ARNm correspondiente, formando una molécula bicatenaria. Los ácidos nucleicos antisentido interfieren con la traducción del ARNm, ya que la célula no traducirá un ARNm que sea bicatenario. Se prefieren oligómeros antisentido de aproximadamente 15 nucleótidos, ya

que se sintetizan fácilmente y es menos probable que causen problemas que las moléculas más grandes cuando se introducen en la célula diana que produce CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2. En la técnica se conoce bien el uso de procedimientos antisentido para inhibir la traducción *in vitro* de genes (véase, por ejemplo, Marcus-Sakura, *Anal. Biochem.* 172:289, 1988).

- 5 Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Un ácido nucleico antisentido se puede construir usando síntesis química y reacciones de ligación enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico antisentido se puede sintetizar químicamente usando nucleótidos de origen natural o se pueden usar nucleótidos modificados de diversas maneras diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, tales como derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden usar para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmethyl) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridin-e, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, entre otros.
- 10 15 El uso de un oligonucleótido para detener la transcripción se conoce como la estrategia de triple hélice, ya que el bloomer se enrolla alrededor del ADN de doble hélice, formando una hélice de tres cadenas. Por lo tanto, estos compuestos de triple hélice pueden diseñarse para reconocer un sitio único en un gen elegido (Maher, *et al.*, *Antisense Res. And Dev.* 1(3):227, 1991; Helene, C., *Anticancer Drug Design* 6(6):569), 1991. Este tipo de oligonucleótido inhibidor también es útil en los procedimientos descritos en esta invención.
- 20 25 Las ribozimas, que son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otro ARN monocatenario de una manera análoga a las endonucleasas de restricción del ADN, también son útiles. A través de la modificación de secuencias de nucleótidos que codifican estos ARN, es posible diseñar moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y escindirla (Cech, *J. Amer. Med. Assn.* 260:3030, 1988). Una ventaja importante de este enfoque es que, debido a que son específicos de secuencia, solo se inactivan los ARNm con secuencias particulares.

30 Hay dos tipos básicos de ribozimas, a saber, *de tipo tetrahimena* (Hasselhoff, *Nature* 334:585, 1988) y de tipo "cabeza de martillo". Las ribozimas de tipo tetrahimena reconocen secuencias que tienen cuatro bases de longitud, mientras que las ribozimas de tipo "cabeza de martillo" reconocen secuencias de bases de 11-18 bases de longitud. Cuanto más larga sea la secuencia de reconocimiento, mayor será la probabilidad de que la secuencia se produzca exclusivamente en la especie de ARNm diana. En consecuencia, las ribozimas de tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas de tipo tetrahimena para inactivar una especie específica de ARNm y las secuencias de reconocimiento de 18 bases son preferibles a las secuencias de reconocimiento más cortas.

35 Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar los ARNip y otras moléculas de ácido nucleico inhibidoras como agentes terapéuticos. Dichos sistemas incluyen, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, nanopartículas, células recombinantes capaces de expresar la o las moléculas terapéuticas (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262, 4429, 1987), la construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un vector retroviral u otro vector, y similares.

C. Moléculas pequeñas

40 Antagonistas de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2, y el agonista de 4-1BB, incluyen moléculas que se identifican a partir de grandes bibliotecas de productos naturales o extractos sintéticos (o semisintéticos) o bibliotecas químicas según los procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos de detección que detectan disminuciones en la actividad de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 (como la detección de muerte celular para PD-1, PD-L1 y PD-L2) son útiles para identificar compuestos de una variedad de fuentes para la actividad. Procedimientos de detección que detectan aumentos en la actividad de 4-1BB también son útiles para identificar compuestos de tales fuentes. Las detecciones iniciales se pueden realizar utilizando una biblioteca diversa de compuestos, una variedad de otros compuestos y bibliotecas de compuestos. Por lo tanto, se pueden identificar moléculas que se unen a CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 que inhiben la expresión de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 y moléculas que inhiben la actividad de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2. También se pueden identificar moléculas que aumentan la expresión y/o actividad de 4-1BB. Estas moléculas pequeñas se pueden identificar a partir de bibliotecas combinatorias, bibliotecas de productos naturales u otras bibliotecas de moléculas pequeñas. Además, antagonistas de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 y PD-L2, y los agonistas de 4-1BB, se pueden identificar como compuestos de fuentes comerciales, así como análogos disponibles comercialmente de inhibidores identificados. En algunas realizaciones, la molécula pequeña tiene menos de 900 daltons, o menos de 800 daltons.

45 50 La fuente precisa de extractos o compuestos de prueba no es crítica para la identificación de antagonistas. Por consiguiente, los antagonistas se pueden identificar a partir de prácticamente cualquier número de extractos o compuestos químicos. Ejemplos de dichos extractos o compuestos que pueden ser antagonistas incluyen, entre otros, extractos de origen vegetal, fúngico, procariota o animal, caldos de fermentación y compuestos sintéticos, así como la modificación de compuestos existentes. También están disponibles numerosos procedimientos para generar síntesis

aleatoria o dirigida (por ejemplo, semisíntesis o síntesis total) de cualquier cantidad de compuestos químicos, que incluyen, entre otros, compuestos basados en sacáridos, lípidos, péptidos y ácidos nucleicos. Bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente en Brandon Associates (Merrimack, N.H.) y Aldrich Chemical (Milwaukee, Wis.). Agonistas y antagonistas se pueden identificar a partir de bibliotecas de compuestos sintéticos que están disponibles comercialmente en varias compañías, incluidas Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), Comgenex (Princeton, N. J.), Brandon Associates (Merrimack, N.H.) y Microsource (New Milford, Conn.). Antagonistas de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 y PD-L2, o agonistas de 4-1BB, se pueden identificar a partir de una biblioteca química rara, como la biblioteca disponible de Aldrich (Milwaukee, Wis.). Antagonistas de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 y PD-L2, o agonistas de 4-1BB, se pueden identificar en bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales disponibles comercialmente de una serie de fuentes, que incluyen Biotics (Sussex, Reino Unido), Xenova (Slough, Reino Unido), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, Florida) y PharmaMar, EE. UU. (Cambridge, Mass.). Bibliotecas y compuestos naturales y producidos sintéticamente se modifican fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales.

Compuestos útiles se pueden encontrar dentro de numerosas clases químicas, aunque típicamente son compuestos orgánicos, incluidos los compuestos orgánicos pequeños. Se pueden utilizar compuestos orgánicos pequeños con un peso molecular de más de 50 pero menos de aproximadamente 2.500 daltons, tal como menos de aproximadamente 750 o menos de aproximadamente 350 daltons en los procedimientos descritos en esta invención. Clases ejemplares incluyen heterociclos, péptidos, sacáridos, esteroides y similares. Los compuestos pueden modificarse para mejorar la eficacia, estabilidad, compatibilidad farmacéutica y similares. En varias realizaciones, los compuestos de uso tienen una Kd para CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 de menos de 1nM, menos de 10nm, menos de 1 μ M, menos de 10 μ M o menos de 1mM.

D. Variantes peptídicas

También se puede utilizar una inmunoadhesina que se une específicamente a CTLA-4 humano, BTLA humano, TIM-3 humano, LAG3 humano, PD-1 humano, PD-L1 humano o PD-L2 humano. Una inmunoadhesina es una proteína de fusión que contiene la porción extracelular o de unión de una proteína fusionada a una región constante tal como una región Fc de una molécula de inmunoglobulina. Ejemplos de moléculas de inmunoadhesión que se unen específicamente a PD-1 se describen en las publicaciones PCT n.º WO2010/027827 y WO2011/066342. Estas moléculas de inmunoadhesión incluyen AMP-224 (también conocido como B7-DC Ig), que es una proteína de fusión PD-L2-FC. Se describen antagonistas de PD-1 adicionales que son proteínas de fusión, por ejemplo, en la solicitud de patente publicada de EE. UU. n.º 2014/0227262.

En una realización, un antagonista de LAG3 de uso en los procedimientos descritos es IMP321, un LAG3 soluble, que se ha utilizado para activar células dendríticas. En otra realización, antagonistas de aTIM-3, si se usan en los procedimientos descritos, son CA-327 (Curis).

Un antagonista de CTLA-4 puede ser una proteína negativa dominante o una inmunoadhesina, véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de los EE. UU. n.º 2016/0264643. Antagonistas anti-CTLA-4 adicionales incluyen cualquier inhibidor, que incluye, pero no se limita a, una molécula pequeña, que puede inhibir la capacidad de CTLA-4 para unirse a su ligando afín, alterar la capacidad de B7 para CTLA-4, alterar la capacidad de CD80 para unirse a CTLA-4, alterar la capacidad de CD86 para unirse a CTLA-4.

En una realización, las variantes de una proteína CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 que funcionan como un antagonista se pueden identificar mediante el cribado de bibliotecas combinatorias de mutantes, tales como mutantes puntuales o mutantes de truncamiento, de una proteína CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 para identificar proteínas con actividad antagonista. En un ejemplo, el antagonista es una proteína soluble.

En realizaciones adicionales, las variantes de 4-1BB que funcionan como un agonista se pueden identificar mediante el cribado de bibliotecas combinatorias de mutantes de 4-1BB, tales como mutantes de mutación puntual o de truncamiento, para identificar una proteína con actividad agonista. El agonista puede ser una proteína soluble.

Por lo tanto, se puede generar una biblioteca de variantes de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB mediante mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico y está codificada por una biblioteca génica variada. Se puede producir una biblioteca de variantes de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de modo que un conjunto degenerado de secuencias potenciales sea expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (como para la presentación en fagos) que contiene el conjunto de secuencias de interés.

Hay una variedad de procedimientos, que se pueden usar para producir bibliotecas de variantes potenciales de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada se puede realizar en un sintetizador automático de ADN, y el gen sintético a continuación se liga en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias

potenciales de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB. En la técnica se conocen procedimientos para sintetizar oligonucleótidos degenerados (véase, por ejemplo, Narang, et al., Tetrahedron 39:3, 1983; Itakura et al. Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; Itakura et al. Science 198:1056, 1984).

Además, se pueden usar bibliotecas de fragmentos de una secuencia codificante de proteína CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB para generar una población de fragmentos para el cribado y la posterior selección de variantes de un antagonista (o agonista, en el caso de 4-1BB) especificado. En una realización, se puede generar una biblioteca de fragmentos de secuencias codificantes mediante el tratamiento de un fragmento de PCR bicatenario de una secuencia codificante de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB con una nucleasa en condiciones donde la melladura se produce solo aproximadamente una vez por molécula, la desnaturalización del ADN bicatenario, la renaturalización del ADN para formar ADN bicatenario que puede incluir pares sentido/antisentido

de diferentes productos mellados, la eliminación de porciones monocatenarias de dúplex reformados mediante tratamiento con nucleasa SI y la ligadura de la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este procedimiento, se puede derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales, C-terminales e internos de varios tamaños de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2 o 4-1BB.

En la técnica se conocen varias técnicas para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias hechas por mutaciones puntuales o truncamiento, y para cribar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para el cribado rápido de las bibliotecas de genes generadas por la mutagénesis combinatoria de proteínas. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para el cribado de grandes bibliotecas de genes incluyen típicamente la clonación de la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatorios en condiciones donde la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de conjunto recursivo (REM) se puede usar en combinación con los ensayos de detección para identificar antagonistas de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2, o un agonista de 4-1BB (Arkin y Youvan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811 7815, 1992; Delagrange et al., Protein Eng. 6(3):327 331, 1993).

En una realización, los ensayos basados en células se pueden explotar para analizar una biblioteca de variantes de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2. Por ejemplo, una biblioteca de vectores de expresión puede transfectarse en una línea celular, que normalmente sintetiza y secreta CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2. Las células transfectadas se cultivan a continuación de modo que se secretan CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 y una variante particular de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 (respectivamente). El efecto de la expresión del mutante sobre la actividad en células o en sobrenadantes se puede detectar, tal como mediante cualquiera de un ensayo funcional. A continuación, el ADN plasmídico se puede recuperar de las células donde se inhibe la actividad endógena, y los clones individuales se pueden caracterizar adicionalmente.

Peptidomiméticos también se pueden utilizar como antagonistas de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2. Análogos peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se desarrollan en general con la ayuda de modelos moleculares computarizados. Miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles se pueden usar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (por ejemplo, un polipéptido que tiene una actividad biológica de PD-1), pero tiene uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por enlaces -CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂--CH₂--, --CH=CH-- (cis y trans), --COCH₂-, --CH(OH)CH₂--, y --CH₂SO--. Estos enlaces peptídicos se pueden reemplazar por procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Morley, Trends Pharm. Sci. pp. 463 468, 1980; Hudson et al. Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177 185, 1979; Spatola, Life Sci. 38:1243 1249, 1986; Holladay, et al. Tetrahedron Lett. 24:4401 4404, 1983). Miméticos de péptidos se pueden obtener de forma económica, ser estables y pueden tener una mayor vida útil o absorción. La marcación de peptidomiméticos en general implica la unión covalente de uno o más marcadores, directamente o a través de un espaciador (tal como por un grupo amida), a una o más posiciones no interferentes en el peptidomimético que se predice mediante datos cuantitativos de estructura-actividad y/o modelado molecular. Dichas posiciones que no interfieren en general son posiciones que no forman contactos directos con las macromoléculas a las que se une el peptidomimético para producir el efecto terapéutico. La derivatización de peptidomiméticos no debe interferir sustancialmente con la actividad biológica o farmacológica deseada del peptidomimético.

Una proteína negativa dominante o un ácido nucleico que codifica una proteína negativa dominante que interfiere con la actividad biológica de CTLA-4, BTLA, TIM-3, LAG3, PD-1, PD-L1 o PD-L2 también se puede usar en los procedimientos descritos en esta invención. Una proteína negativa dominante es cualquier molécula de aminoácidos que tiene una secuencia que tiene al menos 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso 99 % de identidad de secuencia con al menos 10, 20, 35, 50, 100 o más de 150 aminoácidos de la proteína de tipo salvaje a la que corresponde la proteína negativa dominante. Por ejemplo, un PD-L1 dominante negativo tiene una mutación tal que se une a PD-1 más estrechamente que a PD-1 nativo (de tipo salvaje), pero no activa ninguna señalización celular a través de PD-1.

La proteína negativa dominante puede administrarse como un vector de expresión. El vector de expresión puede ser un vector no vírico o un vector vírico (por ejemplo, retrovirus, virus adenoasociado recombinante o un vector adenovírico recombinante). Alternativamente, la proteína negativa dominante se puede administrar directamente como

una proteína recombinante sistémicamente o en el área infectada utilizando, por ejemplo, técnicas de microinyección.

Antagonistas de polipéptidos se pueden producir en células huéspedes procariotas o eucariotas mediante la expresión de polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos, frecuentemente como parte de un polipéptido más grande (una proteína de fusión, tal como con ras o una enzima). Alternativamente, dichos péptidos se pueden sintetizar mediante procedimientos químicos. Procedimientos para la expresión de proteínas heterólogas en huéspedes recombinantes, la síntesis química de polipéptidos y la traducción *in vitro* son bien conocidos en la técnica (véase Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), 2a Ed., Cold Spring Harbor, N.Y.; Berger y Kimmel, Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Kaiser et al., Science 243:187, 1989; Merrifield, Science 232:342, 1986; Kent, Annu. Rev. Biochem. 57:957, 1988).

Se pueden producir péptidos, tal como mediante síntesis química directa, y usarse como antagonistas. Los péptidos se pueden producir como péptidos modificados, con restos no peptídicos unidos por enlace covalente al extremo N y/o al extremo C. En determinadas realizaciones preferidas, el extremo carboxi o el extremo amino, o ambos, se modifican químicamente. Las modificaciones más comunes de los grupos amino y carboxilo terminales son la acetilación y la amidación, respectivamente. Las modificaciones amino-terminales tales como acilación (por ejemplo, acetilación) o alquilación (por ejemplo, metilación) y modificaciones carboxi-terminales tales como amidación, así como otras modificaciones terminales, incluida la ciclación, pueden incorporarse en diversas realizaciones. Ciertas modificaciones amino-terminales y/o carboxi-terminales y/o extensiones peptídicas a la secuencia central pueden proporcionar propiedades físicas, químicas, bioquímicas y farmacológicas ventajosas, tales como: estabilidad mejorada, mayor potencia y/o eficacia, resistencia a las proteasas séricas, propiedades farmacocinéticas deseables y otras.

La descripción se ilustra además mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

Muestras de sangre de donantes sanos y muestras de sangre y tejido de pacientes: Se obtuvieron muestras de sangre periférica, ganglios linfáticos no involucrados, ganglios linfáticos metastásicos y tumorales de individuos con HNSCC, melanoma, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, metástasis hepática colorrectal y cáncer de ovario. Todos los sujetos firmaron un consentimiento informado por escrito aprobado por la Junta de Revisión Institucional del instituto (Providence Portland Medical Center, IRB).

En el momento de la recolección de la muestra, los pacientes no estaban sometidos a terapia. Anteriormente, se habían sometido a una amplia gama de terapias, que incluían quimioterapia, radioterapia, cirugía e inmunoterapia, o ninguna de las anteriores.

Células mononucleares de sangre periférica se purificaron de sangre completa sobre un gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) y se criconservaron antes del análisis.

Las muestras tumorales se prepararon como sigue: En resumen, en condiciones estériles, los tumores se cortaron en trozos pequeños y se digirieron en RPMI-1640 complementado con hialuronidasa a 0,5 mg/ml, colagenasa a 1 mg/ml (ambos Sigma-Aldrich), ADNasa a 30 U/ml (Roche), así como albúmina sérica humana (MP Biomedicals) a una concentración final del 1,5 %. Células se digirieron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación con una barra de agitación magnética. Las suspensiones celulares se filtraron a través de un filtro de 70 µm. Los linfocitos infiltrantes de tumores se enriquecieron como se describió anteriormente mediante centrifugación de densidad Ficoll-Paque PLUS. Las suspensiones de células individuales tumorales se criconservaron hasta un análisis adicional.

Anticuerpos y citometría de flujo: Anticuerpos marcados con fluorescencia se adquirieron en los siguientes fabricantes:

Biolegend: CD3 (UCHT1), CD4 (OKT-4 o RPA-T4), CD8 (RPA-T8), CD25 (BC96),

CD38 (HIT2), CD45RA (HI100), CD69 (FN50), HLA-DR (L243), CTLA-4 (BNI3), 4-1BB (4B4-1), CCR7 (G043H7), Granzyme B (GB11), IFN- γ (4S.B3), TNF- α (Mab 11)

BD Bioscience: CD27 (M-T271), CD127 (HIL-7R-M21), PD-1 (EH12), Ki-67 (B56),

eBioscience: CD28 (CD28.2), CD39 (eBioA1), CD103 (Ber-ACT8 and B-Ly7), FOXP3 (PCH101), ICOS (ISA-3)

R&D: TIM-3 (344823)

Se usó un colorante vivo/muerto fijable para distinguir las células viables (Biolegend). La tinción de la superficie celular se realizó en tampón FACS (PBS, complementado con FBS al 1 % y NaN₃ al 0,01 %). La tinción intracelular se realizó utilizando el kit Fix/Perm de eBioscience según las instrucciones del fabricante. Para analizar la producción de citocinas

por las células mononucleares de sangre periférica y TIL ex vivo, las células se estimularon durante 5 h con PMA (0,2 μ M) y lonomicina (1 μ g/ml), con BFA (10 μ g/ml) presente durante las últimas 2 1/2 h. La tinción intracelular de citocinas se realizó utilizando el kit CytoFix/CytoPerm de BD Bioscience según las instrucciones del fabricante. Células teñidas se adquirieron en un citómetro de flujo LSRII y Fortessa, o el FACS Ariall (todos BD), para la clasificación celular. Los datos se analizaron con el software FlowJo (Treestar).

Clasificación de células y expansión de células T: PBMC y TIL crioconservadas se descongelaron y enriquecieron en linfocitos T utilizando el kit de enriquecimiento de células T de Stemcell. Para el enriquecimiento de TIL, se añadieron perlas de Epcam (StemCell) al cóctel. Las fracciones enriquecidas se marcaron y las poblaciones de interés se purificaron después de la clasificación celular hasta una pureza del 99 % en un FACS Ariall (BD).

- 10 Para el análisis de secuenciación de TCR, los sedimentos celulares se congelaron hasta su procesamiento adicional.
- Para la expansión de DN CD8+, SP CD8+ y DP CD8+ TIL, así como CD8 sin tratamiento previo y de memoria de PBMC, las células T se clasificaron y cultivaron en RPMI-1640 completo, complementado con glutamina 2 mM, 1 % (v/v) de aminoácidos no esenciales, 1 % (v/v) de piruvato de sodio, penicilina (50 U/ml), estreptomicina (50 ug/ml) y 10 % de suero bovino fetal (Hyclone). Células T (de 2000 a 5000 células/pocillo) se estimularon políclonalmente con 1 μ g/ml de PHA (Sigma) en presencia de células alimentadoras alogénicas irradiadas (4000 rad) (2×10^5 células/pocillo) y 10 ng/ml de rh IL-15 (Biolegend) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Corning/Costar). Después de 1 semana, una vez que se formaron los grupos de células T, las células se dividieron en una placa adicional de 96 pocillos en medio completo con IL-15, que se repitió nuevamente después de 2 días, lo que dio como resultado 4 réplicas idénticas. Las cuatro réplicas se agruparon a continuación en un pocillo de una placa de 24 pocillos el día 12.
- 20 Las líneas de células T se mantuvieron hasta el análisis.

25 *Adquisición de datos de micromatriz:* Las muestras para la micromatriz se procesaron de una manera similar al análisis de flujo. La digestión del tumor se completó en un tubo cónico de 50 ml con una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 hora con colagenasa a 1 mg/ml (Sigma, C-5138), haluronidasa a 0,5 mg/ml (Sigma, H-6254) en RPMI (Life Technologies, 11875-093) con albúmina humana al 0,3 % (MP Biomedicals 823051) y 30 U/ml de DNASE (Roche 04536282001). Las siguientes muestras de digestión se filtraron a través de un filtro de 70 μ m. A continuación, las muestras se diluyeron 1:2 con RPMI y se colocaron en capas en Ficoll (GE, 17-1440-02) para enriquecer los linfocitos a través de una etapa de centrifugación. Células enriquecidas se tiñeron para CD3, CD8, CD103, CD39 y se clasificaron usando un clasificador de células BD FACSaria. Células clasificadas se lisaron y el ARN se purificó utilizando el kit de minipreparación de ARN Direct-zol (zymo research). El ARN se transcribió de forma inversa a ADNc y se amplificó. El ADNc amplificado se hibridó en un chip genético Prime-View de Affymetrix.

30 *Análisis de datos de micromatriz:* Archivos CHP, producidos por Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC) v. 3.1.1 y Affymetrix Expression Console v. 1.1 software de la matriz de expresión génica Affymetrix Primeview se cargaron utilizando el software BRB ArrayTools, Versión 4.5.1 (disponible en Internet, brb_nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/), y se anotaron con su tipo de muestra (es decir, DN, SP, DP). El módulo de control de calidad de Affymetrix se ejecutó para determinar que los resultados de la expresión estaban dentro de las especificaciones (aplica el módulo BioConductor R: affy/affyQCReport). La expresión diferencial entre los tipos de muestra se determinó utilizando el módulo de comparación de clases/entre grupos de matrices BRBarray, utilizando un umbral de significación establecido de la prueba univariante (informa las pruebas de mínimos cuadrados y Kolmogorov-Smirnov ordenadas por el valor p de la prueba univariante). Luego se utilizó el módulo Gráficos/Visualización de muestras para producir un análisis multidimensional de los 3 grupos utilizando genes seleccionados (aplica el módulo BRBarray R: MDS.R).

35 *Activación de células T in vitro:* Los subconjuntos de células T CD8 vírgenes se aislaron mediante enriquecimiento magnético de células T CD8 (Stemcell), se marcaron con anticuerpos contra CD4, CD8, CD45RA y CCR7 y se clasificaron. Se cultivaron 1×10^5 células T vírgenes con Dynabeads anti-CD3/CD28 (Life Technologies) a una relación de perlas:células T de 1 : 2 en presencia o ausencia de 2ng/ml de rh TGF β -1 (I&D). Después de 24 horas, las perlas se retiraron mediante captura magnética durante la mitad del experimento. La expresión de los marcadores de activación y diferenciación se evaluó los días 1,2,3,4, 7 y 9.

40 *Secuenciación profunda de TCR del gen VB de TCR y análisis de clonalidad:* La secuenciación profunda de las regiones variables V-J o V-D-J de los genes TCR β se realizó en el ADN genómico de poblaciones de células T clasificadas. El ADN se extrajo de subconjuntos de células T CD8 circulantes y residentes en tumores que van desde células 1×10^4 - 1×10^5 (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen). Las regiones CDR3 de TCR β se secuenciaron y mapearon (ImmunoSEQ, Adaptive Biotech). La cobertura por muestra fue >10x. Solo se extrajeron datos de reordenamientos productivos de la plataforma ImmunoSEQ Analyzer para su posterior análisis. La clonalidad de los diferentes subconjuntos de células T se evaluó mediante la comparación de secuencias de nucleótidos de los 500 clones más abundantes en cada subconjunto.

45 Para comparar la superposición (o similitud) de V β de TCR de dos poblaciones dadas, utilizamos el índice de superposición de Morisita. El índice de similitud de Morisita-Horn explica tanto el número de clonotipos comunes como la distribución de los tamaños de los clonotipos, y es más sensible a los tamaños de los clones de los clonotipos dominantes (ref. Venturi et al., J Immunologi Meth, 2008).

Evaluación del reconocimiento de células diana: Requerimiento positivo de 4-1BB y CD25 y secreción de IFN-γ: La regulación positiva de 4-1BB y CD25, así como la liberación de IFN-γ, se utilizaron como medidas para evaluar el reconocimiento de células tumorales por células T CD8 autólogas expandidas. El experimento de cocultivo se realizó 17-20 días después de comenzar la expansión. El día anterior, células T expandidas se contaron y se privaron de alimento durante la noche en medio sin IL-15 para regular negativamente la expresión restante de 4-1BB y CD25. A continuación, se cultivaron células T CD8 expandidas (1×10^5) solas o con células tumorales (autólogas y alogénicas, relación células T: células diana = 10:1). En algunas condiciones, las células tumorales se preincubaron con 30 ug/ml de anticuerpo bloqueante anti-MHC de clase I (BD Bioscience, clon W6/32) durante 3 h antes de añadir las células T. Como control positivo, placas Nunc Maxisorp se recubrieron con anticuerpo anti-CD3 (OKT3) y se añadieron células T. Todas las condiciones se colocaron en placas por triplicado. Después de 24 horas, los sobrenadantes se recogieron y se analizaron mediante análisis de matriz de perlas citométricas (CBA - *cytometric bead array*). Células se agruparon para cada condición y se marcaron con un colorante de viabilidad, seguido de tinción de la superficie celular de CD39, CD 103, CD25 y 4-1BB. Células se analizaron mediante citometría de flujo. Para la CBA, se siguió el protocolo del fabricante. En particular, se analizaron IFN-γ y TNF-α.

15 Ensayo de destrucción de células diana vivas: Ensayos de destrucción de células diana mediada por células T se realizaron en el sistema Incucyte Zoom alojado dentro de una incubadora de células a 37 °C/5 % de CO₂, según el protocolo del fabricante (Essen Bioscience). Para evaluar la destrucción por células T de células tumorales autólogas, se sembraron 5000-10000 células tumorales (líneas celulares tumorales autólogas y alogénicas) por triplicado en una placa de fondo plano de 96 pocillos para alcanzar una confluencia del 10 %. Subconjuntos de células T autólogas expandidas se contaron y se privaron de alimento durante la noche sin IL-15 exógena. A continuación, se cultivaron 1 \times 10⁵ de células T con y sin células tumorales autólogas y alogénicas (proporción de células T: Células tumorales = 10:1). En algunas condiciones, se añadió anticuerpo anti-MHC de clase I (BD Bioscience, clon W6/32). En todas las condiciones, se añadió sustrato de caspasa 3/7 NucView 488 (Essen Bioscience) para controlar la caspasa 3/7 activa. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C y se capturaron cuatro imágenes de tres réplicas experimentales cada hora usando una lente objetivo 10X para visualizar la destrucción por células T y la actividad de caspasa 3/7 (fluorescencia verde). El tiempo de adquisición del canal verde fue de 400 ms. Para el contraste de fase, la segmentación celular se logró mediante la aplicación de una máscara con el fin de excluir las células T más pequeñas. Se aplicó un filtro de área para excluir objetos por debajo de 1000 μm². El ruido de fondo verde se restó con el procedimiento Top-Hat de corrección de no uniformidad de fondo con un radio de 20 μm y un umbral de 2 unidades corregidas en verde. La señal de fluorescencia se cuantificó después de aplicar la máscara al experimento. La cantidad de destrucción/apoptosis por células T se calculó mediante el software Zoom proporcionado (Essen Bioscience).

Análisis Estadístico: Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software Prism (GraphPad, San Diego CA). La significación se determinó mediante análisis ANOVA unidireccional con corrección de Tukey, como se indica en las leyendas de las figuras.

35 Ejemplo 2 - Resultados

La identificación de células T CD8 reactivas al tumor es clave para evaluar el nivel y la calidad de la respuesta antitumoral en pacientes con cáncer y para comprender el modo de acción de las nuevas estrategias de tratamiento del cáncer, como la inmunoterapia. Recientemente, se han identificado células T CD8 reactivas a tumores humanos mediante la coexpresión de CD 103 y PD-1 en el cáncer de ovario seroso de alto grado (HGSC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NCLC). Para definir aún más sus propiedades y función, las células T CD8 infiltrantes de tumores (TIL) se clasificaron de dos tumores de ovario humanos en 103 subconjuntos CD positivos y negativos y su perfil de expresión génica se determinó mediante micromatriz. Para este análisis, se centró la atención en las moléculas de la superficie celular expresadas diferencialmente que podían detectarse fácilmente mediante citometría de flujo. Una de las mayores diferencias observadas en la comparación de matrices de genes que cumplió con los criterios fue ENTPD1, un gen que codifica CD39 y se encuentra en la superficie celular (Tabla 1). Para confirmar el resultado de la matriz génica y comprender mejor la diversidad de células T CD8 infiltrantes de tumores, se tiñeron células T CD8 aisladas de un paciente con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y se cerraron en la población CD103+. Se examinaron CD39 y marcadores adicionales de la superficie celular asociados con la activación/agotamiento, así como el estado de desarrollo. La complejidad del análisis simultáneo de todos los marcadores de citometría de flujo requirió un procedimiento llamado incrustación de vecinos estocásticos distribuidos (Z-SNE), ampliamente utilizado para datos de citometría de masas. Curiosamente, la alta expresión de CD39 en células T CD103+ CD8 se superpuso con altos niveles de expresión de PD-1 y CD69. Por el contrario, las células T CD103+ CD8 expresaron niveles bajos de IL-7R (CD127) (**Figura 1A y 1B**), lo que sugiere un fenotipo de células T más similar al efector. Además, la expresión combinada de CD103 y CD39 en células T CD8 dio como resultado la identificación de tres poblaciones celulares distintas, que incluyen CD103-CD39- (doble negativo (DN) CD8), CD103+CD39- (único positivo (SP) CD8) y CD103+CD39+ (doble positivo (DP) CD8). Las células T DP CD8 se detectaron a frecuencias relativamente altas en varias neoplasias malignas sólidas humanas que incluyen HNSCC, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario y cáncer rectal (**Figura 1C**), aunque el melanoma tuvo la frecuencia más alta de estas células. Por el contrario, las células T CD8 DP estaban presentes en frecuencias bastante bajas en un subconjunto de pacientes con HNSCC, así como en la mayoría de los pacientes con cáncer de colon y metástasis hepática colorrectal (CRLM) (**Figuras 1C y 1D**). Sorprendentemente, TIL de un paciente con cáncer de colon contenía una frecuencia muy alta de células T DP CD8. A este paciente se le diagnosticó el síndrome de Lynch, un trastorno hereditario poco frecuente causado por mutaciones en los genes de reparación de desajustes que conducen a una

mayor tasa de mutaciones. Curiosamente, los tumores con una mayor frecuencia de mutaciones tienen una mayor probabilidad de tener una gran cantidad de neoantígenos y esos pacientes tienen un mejor resultado para la inmunoterapia de bloqueo de puntos de control, como lo ilustra la supervivencia libre de progresión prolongada (Le DT, N Engl J Med 2015; Snyder A, N Engl J Med 2014; Van Allen EM, Science 2015; Rizvi NA, Science 2015).

5 A continuación, se examinó si las células T DP CD8 se encontraban solo en sitios donde había células tumorales. Para abordar esto, se analizaron varios pacientes con HNSCC donde obtuvimos acceso al tumor primario, ganglios linfáticos metastásicos (LN), LN no involucrados y sangre periférica.

10 En la Figura se muestran los resultados de un paciente representativo, donde la coexpresión de CD39 y CD103 por las células T CD8 se encontró específicamente en el tumor primario y el LN metastásico, pero ausente o presente a muy baja frecuencia en las células T CD8 en la sangre periférica y el LN no involucrado. Es importante destacar que este perfil de expresión se confirmó en la mayoría de los pacientes con HNSCC que se analizaron (**Figura 1F**). Por lo tanto, los resultados muestran que la expresión de CD39 en células T CD103+CD8 identifica una población de células T CD8 inducida específicamente dentro del microentorno tumoral.

15 Para comprender mejor la biología de las células T CD8 DN, SP y DP, las tres poblaciones de células se clasificaron directamente *ex vivo* y sus perfiles de expresión génica global se determinaron mediante micromatrices. Para este análisis, se aislaron células T de tres HNSCC y dos tumores de ovario. La comparación entre las células T CD8 DP y DN identificó 372 genes expresados diferencialmente entre estas dos poblaciones de células. El análisis de componentes principales y el agrupamiento jerárquico no supervisado en esta lista de genes seleccionados revelaron que las células T DP y DN CD8 tenían perfiles de ARNm distintos, mientras que las células T SP CD8 mostraron una firma génica intermedia (Figuras 2a y b).

20 25 30 El análisis de componentes principales y la agrupación jerárquica no supervisada realizada en este conjunto seleccionado de genes reveló que el perfil de expresión génica era específico del tipo de célula y no se segregaba por paciente (**Figuras 2A, 2B**). Al comparar los transcritos de las células T DP CD8 con respecto a las células T DN CD8, algunos de los mayores aumentos se asociaron con un fenotipo activado/agotado como *Z&MKL67, TNFRSF9, CTLA-4, HAVCR2 y GZMB*. Por el contrario, los genes más regulados negativamente en las células T DP CD8 en relación con las células T DN CD8 estuvieron involucrados en los patrones de recirculación de las células T, como *KLF2, CCR7, SELL, S1PR1, KLF2*. Este perfil de expresión génica es una reminiscencia de una firma de memoria residente T (**Figura 2C**). Es importante destacar que el perfil de expresión para esos ARNm asociados a la activación y recirculación fue consistente en los cinco tumores (**Figura 2D**). Por lo tanto, las células T DP CD8 muestran una firma de expresión génica de células que experimentan estimulación y activación dirigida por antígeno en el tumor, lo que también puede dar como resultado la pérdida de recirculación fuera del tejido tumoral.

35 40 45 Para evaluar aún más las propiedades específicas de las células T CD8 infiltrantes de tumores, se analizó la expresión de marcadores de diferenciación y activación a nivel de proteína mediante citometría de flujo. Las células T DP CD8 expresaron niveles más altos de CD69 en comparación con las células T SP o DN CD8 (**Figura 3A**). CD69 es una molécula de activación que se regula positivamente después de la estimulación de células T y antagoniza la salida de tejidos mediada por el receptor 1-fosfato de esfingosina 1 (SIPR1) (Mackay 2015; Skon 2013). Las células T DP CD8 también exhibieron niveles más bajos de CCR7, IL7R (CD127) y CD28, indicativos de un fenotipo de memoria efectora (ref). Curiosamente, a pesar de que las células T CD8 DN y SP expresaron PD-1, las células T CD8 DP expresaron niveles significativamente más altos de esta proteína (**Figura 3B**). Además, CTLA-4 y TIM-3 se expresaron casi exclusivamente dentro de la población de células T DP CD8. Por lo tanto, las células T DP CD8 mostraron un fenotipo de memoria efectora altamente activado, especialmente en comparación con las células T DN y SP CD8. Además, el aumento de la frecuencia de 4-1BB y Ki-67 dentro de la población de células T DP CD8 sugirió que estas células se activaron y proliferaron recientemente dentro del tumor, lo que es indicativo del reciente reconocimiento del antígeno cognado.

50 55 60 La función efectora de las células T CD8 DN, SP y DP se evaluó directamente *ex vivo* mediante el análisis de su producción de citocinas a nivel de células individuales. Las células T DP CD8 tuvieron una menor frecuencia de células capaces de producir IFN-γ y/o TNF-α en comparación con las células T DN y SP CD8 y se obtuvieron resultados similares en seis pacientes con HNSCC (**Figuras 3C, 3D**). Por el contrario, las células T DP CD8 tenían un mayor potencial citotóxico como lo demuestra una frecuencia significativamente mayor de células positivas para granzima B (**Figura 3E**).

Dado que las células T DP CD8 solo se encontraron en sitios donde estaban presentes células tumorales, se identificaron los factores responsables de este fenotipo particular para comprender mejor el desarrollo de estas células. Se establece que TGF-β impulsa la expresión de CD103 en células T. TGF-β se produce dentro del microambiente tumoral y desempeña un papel importante en la progresión del cáncer a través de la inducción de la transición epitelial-mesenquimal que conduce a una mayor motilidad e invasión. Se encontró expresión de CD39 en células T CD8 crónicamente estimuladas/agotadas en un modelo de ratón de infección crónica por LCMV, así como en pacientes con infecciones crónicas por VHC y VIH (Gupta PK, PLOS Pathogen 2015), lo que respalda un papel para la estimulación sostenida de TCR en su expresión. Por lo tanto, la cinética de la regulación positiva de CD 103 y CD39 se analizó en células T CD8 vírgenes después de la participación de TCR en presencia o ausencia de TGF-β (**Figura 4 y datos complementarios**). Para abordar el papel de la estimulación sostenida de TCR en la expresión de CD39,

las células T se estimularon continuamente con perlas CD3/CD28 durante 9 días o las perlas se retiraron 24 h después del inicio del cultivo. La expresión de CD39 se detectó dentro de los 3 días posteriores al cultivo y su expresión aumentó hasta el día 9. CD103 se reguló positivamente cuando las células T se estimularon en presencia de TGF-β con más del 80 % de las células positivas después de 7 días. La regulación positiva óptima de CD103 y CD39 se encontró solo después de la estimulación sostenida de TCR. Es importante destacar que la falta de regulación positiva de CD39 en ausencia de estimulación sostenida de TCR no se debió a la activación limitada de células T, ya que la expresión de otros marcadores de activación como PD-1 se indujo rápidamente en las células (Figura 4). A diferencia de la expresión de CD103, TGF-β no tuvo ningún efecto sobre la expresión de CD39 en el sistema de cultivo *in vitro*. Por lo tanto,

la estimulación sostenida de TCR y TGF-β son los factores necesarios para promover la expresión de CD103 y CD39 en las células T CD8. Por lo tanto, parece que las células T DP CD8 adquieren su fenotipo tras la exposición repetida a su antígeno afín que conduce a la señalización crónica de TCR dentro del tumor en un entorno rico en TGF-β.

Estos datos sugirieron que las células T DP CD8 reconocen sus antígenos afines dentro del sitio del tumor. Si esto es correcto, conduciría a la expansión selectiva de los clonotipos de TCR dominantes, lo que daría como resultado un aumento de la clonalidad en comparación con las otras poblaciones de células T CD8. Para abordar esto, los clonotipos de TCRβ se evaluaron dentro de las poblaciones de células T CD8 DN, SP y DP, así como de células T CD8 de memoria totales de sangre emparejada y LN no involucrada mediante la secuenciación de la región CDR3 altamente variable de los genes TCRβ. Células T CD8 DP fueron más oligoclonales en comparación con cualquier otra población de células T CD8 analizada (**Figura 5A**). Los 30 clonotipos más frecuentes en cada paciente representaron el 56 %, 61 % y 66 % de la población de células T DP CD8, pero solo el 26 %, 23 % y 38 % de las células T DN CD8 y menos del 20 % de las células T CD8 periféricas de memoria, en un tumor HPV+ HNSCC, un tumor HPV- HNSCC y un tumor de ovario, respectivamente. Los 30 clonotipos de células T CD8 DP expandidos más altos fueron mucho menos frecuentes en la población de células T CD8 DN, y representaron menos del 0,06 % del repertorio de células T CD8 DN para estos tres pacientes. Curiosamente, hubo muy pocos clonotipos de TCR compartidos entre las células T CD8 DP y los otros subconjuntos de células T CD8 infiltrantes de tumores (**Figura 5B**). Por el contrario, un mayor número de los clonotipos de TCR se compartieron entre las células T CD8 DN y las células T CD8 SP. Según lo predicho por la firma de memoria residente (**Figura 2D**), la mayoría de los clonotipos de TCR presentes en las células T CD8 de DN también se compartieron con las células T CD8 de memoria dentro del LN no involucrado en el tumor, así como con las células T CD8 de memoria en la sangre periférica ($R^2=0,7710$ y 0,2022, respectivamente), lo que sugiere que las células T CD8 de DN pudieron recircular, detectando potencialmente el entorno tumoral sin reconocer finalmente su antígeno afín (**Figura 5C**). En comparación, se detectaron muy pocos clonotipos presentes dentro de las células T DP CD8 en el LN no involucrado o en la sangre periférica. El cálculo del índice de Morisita, un índice de similitud basado en la abundancia que determina la superposición entre dos poblaciones, respaldó aún más nuestros resultados y mostró la consistencia de este hallazgo en 5 muestras de pacientes (**Figura 5D**). Colectivamente, estos resultados sugieren que las células T DP CD8 encuentran su antígeno afín dentro del sitio del tumor, lo que da como resultado su activación y expansión local de los clones de células T específicas del tumor.

Si esto es correcto, a continuación el DP CD8 TIL debe enriquecerse para la reactividad tumoral. Por lo tanto, se generaron líneas celulares tumorales autólogas a partir de cuatro tumores de melanoma y dos tumores de HNSCC y determinamos si el DP CD8 TIL estaba enriquecido en cuanto a reactividad y destrucción tumoral. Células T CD8 se clasificaron directamente de los digeridos tumorales según la expresión de CD103 y CD39 y las tres poblaciones de células T CD8 se expandieron *in vitro*. Después de la expansión, se analizó la reactividad de DN, SP y DP CD8 TIL contra líneas celulares tumorales autólogas según lo evaluado por la regulación positiva de 4-1BB, así como la secreción de IFN-γ. En los seis pacientes analizados se descubrió que las células T DP CD8 estaban muy enriquecidas en cuanto a la reactividad tumoral en comparación con DN y SP CD8 TIL (**Figura 6A**). El enriquecimiento en CD8 TIL reactivo al tumor entre las células DP CD8 se ilustró con hasta un 87 % de células T reactivas en la relación más alta de tumor a células T para el paciente 1. El reconocimiento del tumor autólogo fue específico y el MHC de clase I restringido, ya que no se detectó reactividad en el subconjunto DP TIL después del bloqueo del MHC de clase I o cuando las células se cultivaron con una línea celular tumoral alogénica (Figura 6B). Para abordar si las células T DP CD8 reactivas al tumor eran capaces de destruir células tumorales autólogas, los subconjuntos de células T expandidos se cocultivaron con células tumorales autólogas y se monitorearon para determinar la destrucción específica del tumor utilizando el sistema de análisis de células vivas Incucyte. Este sistema permite la visualización de la apoptosis dependiente de caspasa 3/7 mediante microscopía a 37 °C en tiempo real. Según la regulación positiva de 4-1BB, solo las células T CD8 de DP destruyeron células tumorales autólogas como lo ilustra el creciente número de eventos de caspasa 3/7+ (**Figuras 6C, 6D**). Esta destrucción fue dependiente de MHC de clase I ya que el anticuerpo de MHC de clase I W6/32 bloqueó este efecto. Por el contrario, hubo poca o ninguna destrucción de células tumorales autólogas observada por las células T CD8 DN.

Finalmente, se evaluó la relación entre la frecuencia de DP CD8 TIL y la supervivencia del paciente en muestras quirúrgicas. Este análisis se centró en una pequeña cohorte de pacientes con HNSCC (n = 62). Después de la cirugía, la frecuencia de las células T CD8 DP entre el total de CD8 TIL se determinó dentro de los tumores primarios mediante citometría de flujo y los pacientes recibieron tratamiento(s) de atención estándar. Los pacientes se segregaron según la frecuencia de las células T DP CD8, con un grupo alto y uno bajo en relación con la frecuencia media de las células T DP CD8 para esta cohorte. Usando esta estrategia, se encontró que los pacientes cuyos tumores tenían un mayor porcentaje de DP CD8 TIL en el momento de la cirugía se correlacionaron con una mayor supervivencia general (OS - overall survival) (**Figura 6E**), que mostró una mayor importancia en el subgrupo negativo para VPH (**Figura 6F**).

Colectivamente, se demostró que la coexpresión de CD103 y CD39 enriquece fuertemente el TIL de CD8 reactivo al tumor y su frecuencia se correlacionó con un aumento en la supervivencia general en pacientes con HNSCC.

Según estos resultados, se abordó si los clonotipos de TCR presentes a altas frecuencias en DP CD8 TIL eran realmente específicos del tumor. DP CD8 TIL se cocultivaron con células tumorales autólogas durante 20 h, seguido de la clasificación de las células T 4-1BB+CD25+ CD8. La mayoría de los clonotipos presentes a alta frecuencia ex vivo se encontraron dentro de la fracción 4-1BB+CD25+ de DP CD8 TIL cuando estas células T se cocultivaron con líneas tumorales autólogas, lo que demuestra que eran reactivas al tumor (**Figuras 7A, 7B**). Los datos implican que la utilización de TCR de la población DP CD8 sería terapéutica en un entorno de transferencia adoptiva. Cabe destacar que se observó una fuerte superposición del repertorio DP CD8 TIL TCR entre el tumor primario y el LN metastásico dentro del mismo paciente, en dos muestras diferentes de HNSCC (**Figura 7C**). Este resultado es significativo, ya que sugiere que el mismo DP CD8 TIL TCR podría aislarse de un LN metastásico o un tumor primario y usarse para la terapia con TCR.

En vista de las muchas realizaciones posibles a las que se pueden aplicar los principios de la invención descrita, debe reconocerse que las realizaciones ilustradas son solo ejemplos preferidos de la invención y no deben tomarse como limitantes del alcance de la invención. Más bien, el alcance de la invención se define en las siguientes reivindicaciones. Por lo tanto, reivindicamos como nuestra invención todo lo que está dentro del alcance de estas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Células T autólogas CD8⁺CD39⁺CD103⁺ derivadas de un tumor para su uso en el tratamiento de un tumor autólogo en un sujeto, donde las células T autólogas CD8⁺CD39⁺CD103⁺ se administran al sujeto antes, después o simultáneamente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de Muerte Programada (PD)-

5 1, un antagonista de Ligando de Muerte Programada (PD-L1), un antagonista de Proteína 4 Asociada a Linfocitos T Cítotóxicos (CTLA-4), un antagonista Atenuador de Linfocitos B y T (BTLA), antagonista de inmunoglobulina de células T que contiene el dominio de mucina 3 (TIM-3), un antagonista del Gen de Activación de Linfocitos 3 (LAG3), o un agonista de 4-1BB.

10 2. Un inhibidor de puntos de control para su uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto, donde se ha indicado que el sujeto responde a la inhibición de puntos de control detectando un aumento en la cantidad de células T CD8⁺CD39⁺ CD103⁺ en una muestra biológica del sujeto en comparación con un control.

15 3. El inhibidor de punto de control para su uso según la reivindicación 2, donde el inhibidor de punto de control es un antagonista de muerte programada (PD)-1, un antagonista de ligando de muerte programada (PD-L1), un antagonista de proteína 4 asociada a linfocitos T cítotóxicos (CTLA-4), un antagonista atenuador de linfocitos B y T (BTLA), un antagonista de inmunoglobulina de células T que contiene el dominio de mucina 3 (TIM-3), un antagonista del gen de activación de linfocitos 3 (LAG3) o un agonista de 4-1BB.

20 4. Las células T autólogas CD8⁺CD39⁺ CD103⁺ para su uso según la reivindicación 1, o el inhibidor de puntos de control para su uso según la reivindicación 3, donde:

25 (1) a) el antagonista de PD-1 es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1, o un fragmento de unión al antígeno del mismo; b) el antagonista de PD-L1 es un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; c) el antagonista de CTLA-4 es un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; d) el antagonista de BTLA es un anticuerpo que se une específicamente a BTLA o un fragmento de unión al antígeno del mismo; e) el antagonista de TIM-3 es un anticuerpo que se une específicamente a TIM-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; e) el antagonista de LAG3 es un anticuerpo que se une específicamente a LAG3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo,

30 donde preferentemente el anticuerpo que se une específicamente a PD-1, el anticuerpo que se une específicamente a PD-L1, el anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4, el anticuerpo que se une específicamente a BTLA, el anticuerpo que se une específicamente a TIM-3 o el anticuerpo que se une específicamente a LAG3, es un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado; o (2) el antagonista de PD-1, el antagonista de PD-L1, el antagonista de CTLA-4, el antagonista de BTLA, el antagonista de TIM-3 o el antagonista de LAG3, es un ARN inhibidor pequeño, un ARN antisentido, una ribozima, una molécula pequeña o una proteína negativa dominante.

35 5. Las células T autólogas CD8⁺CD39⁺ CD103⁺ para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4, donde:

(1) el tumor es un tumor sólido, donde opcionalmente el tumor sólido es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células renales de cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, glioblastoma o cáncer rectal;

(2) se reseca el tumor; y/o

40 (3) el sujeto es un ser humano.

6. Un procedimiento para determinar si un sujeto con un tumor responderá a un inhibidor de puntos de control, que comprende:

determinar el número de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ en una muestra biológica del sujeto,

donde al sujeto se le ha administrado una primera dosis del inhibidor de puntos de control,

45 donde un aumento en el número de células T CD8⁺CD39⁺CD103⁺ en la muestra biológica en comparación con un control indica que la primera dosis del inhibidor de puntos de control es eficaz para tratar el tumor en el sujeto.

7. El procedimiento según la reivindicación 6, donde el inhibidor de punto de control es un antagonista de muerte programada (PD)-1, un antagonista de ligando de muerte programada (PD-L1), un antagonista de proteína 4 asociada a linfocitos T cítotóxicos (CTLA-4), un antagonista atenuador de linfocitos B y T (BTLA), un antagonista de inmunoglobulina de células T que contiene el dominio de mucina 3 (TIM-3), un antagonista de gen de activación de linfocitos 3 (LAG3) o un agonista de 4-1BB.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, donde

(1) a) el antagonista de PD-1 es un anticuerpo que se une específicamente a PD-1, o un fragmento de unión al antígeno del mismo; b) el antagonista de PD-L1 es un anticuerpo que se une específicamente a PD-L1 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; c) el antagonista de CTLA-4 es un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; d) el antagonista de BTLA es un anticuerpo que se une específicamente a BTLA o un fragmento de unión al antígeno del mismo; e) el antagonista de TIM-3 es un anticuerpo que se une específicamente a TIM-3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo; e) el antagonista de LAG3 es un anticuerpo que se une específicamente a LAG3 o un fragmento de unión al antígeno del mismo,

10 donde preferentemente el anticuerpo que se une específicamente a PD-1, el anticuerpo que se une específicamente a PD-L1, el anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4, el anticuerpo que se une específicamente a BTLA, el anticuerpo que se une específicamente a TIM-3 o el anticuerpo que se une específicamente a LAG3, es un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado; o

15 (2) el antagonista de PD-1, el antagonista de PD-L1, el antagonista de CTLA-4, el antagonista de BTLA, el antagonista de TIM-3 o el antagonista de LAG3, es un ARN inhibidor pequeño, un ARN antisentido, una ribozima, una molécula pequeña o una proteína negativa dominante.

9. El inhibidor de puntos de control para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, o el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 y 8, donde la muestra es una muestra de sangre periférica o una biopsia tumoral.

20 10. El inhibidor de puntos de control para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, o el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde el sujeto es un ser humano.

11. El inhibidor de puntos de control para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, o el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde el tumor es un tumor sólido.

25 12. El inhibidor de punto de control para su uso según la reivindicación 11, o el procedimiento según la reivindicación 11, donde el tumor sólido es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de mama, glioblastoma o cáncer rectal.

FIG. 1A

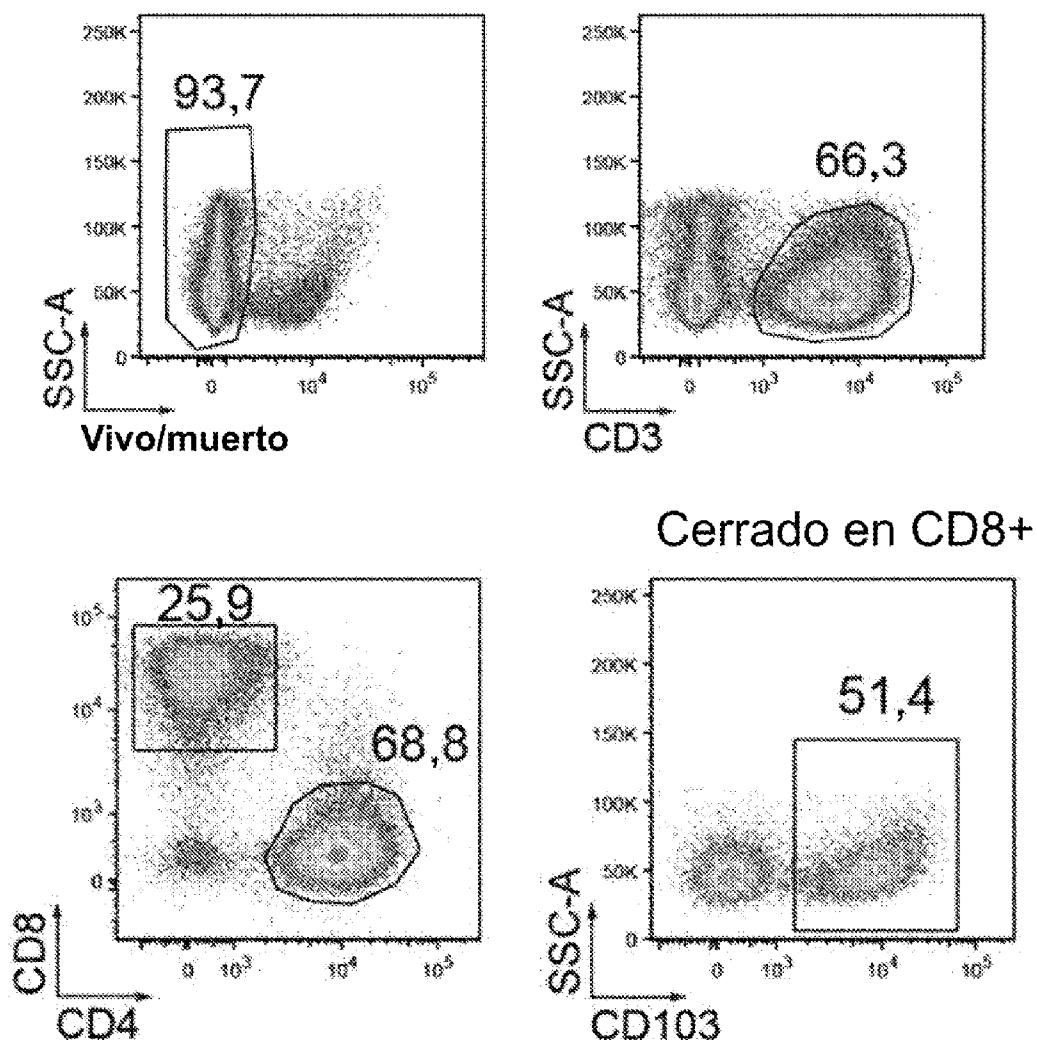


FIG. 1B

Cerrado en CD8+CD103+

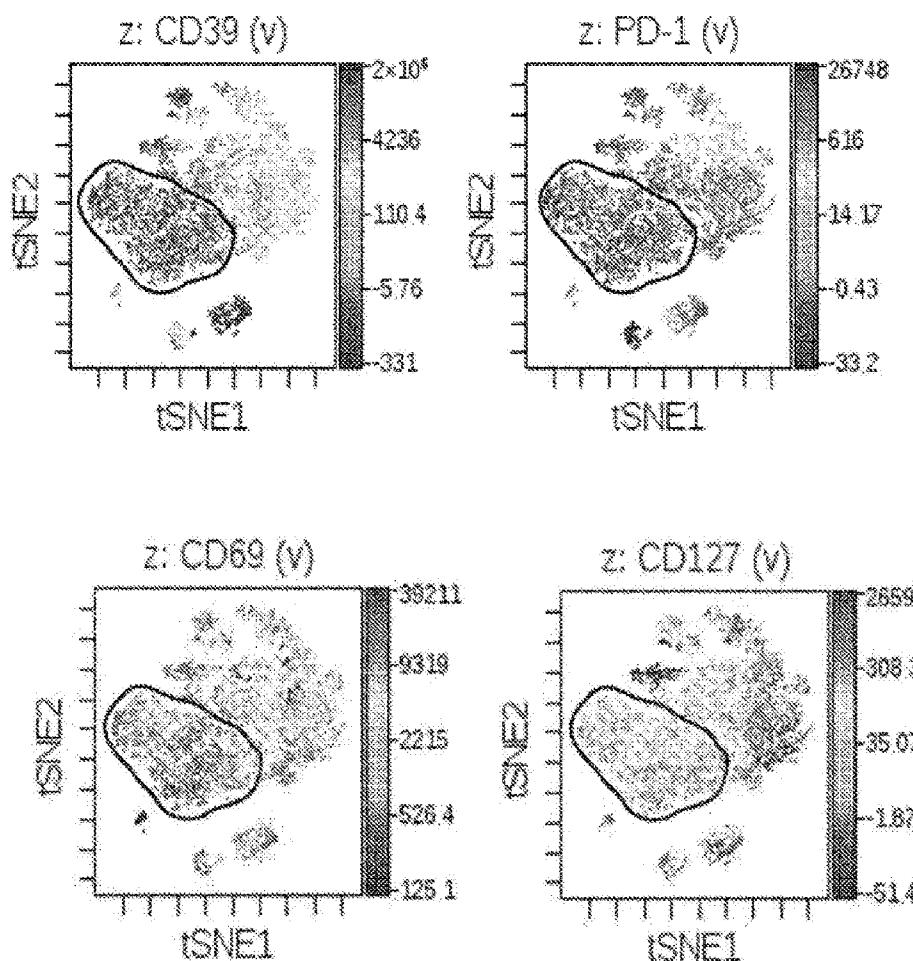


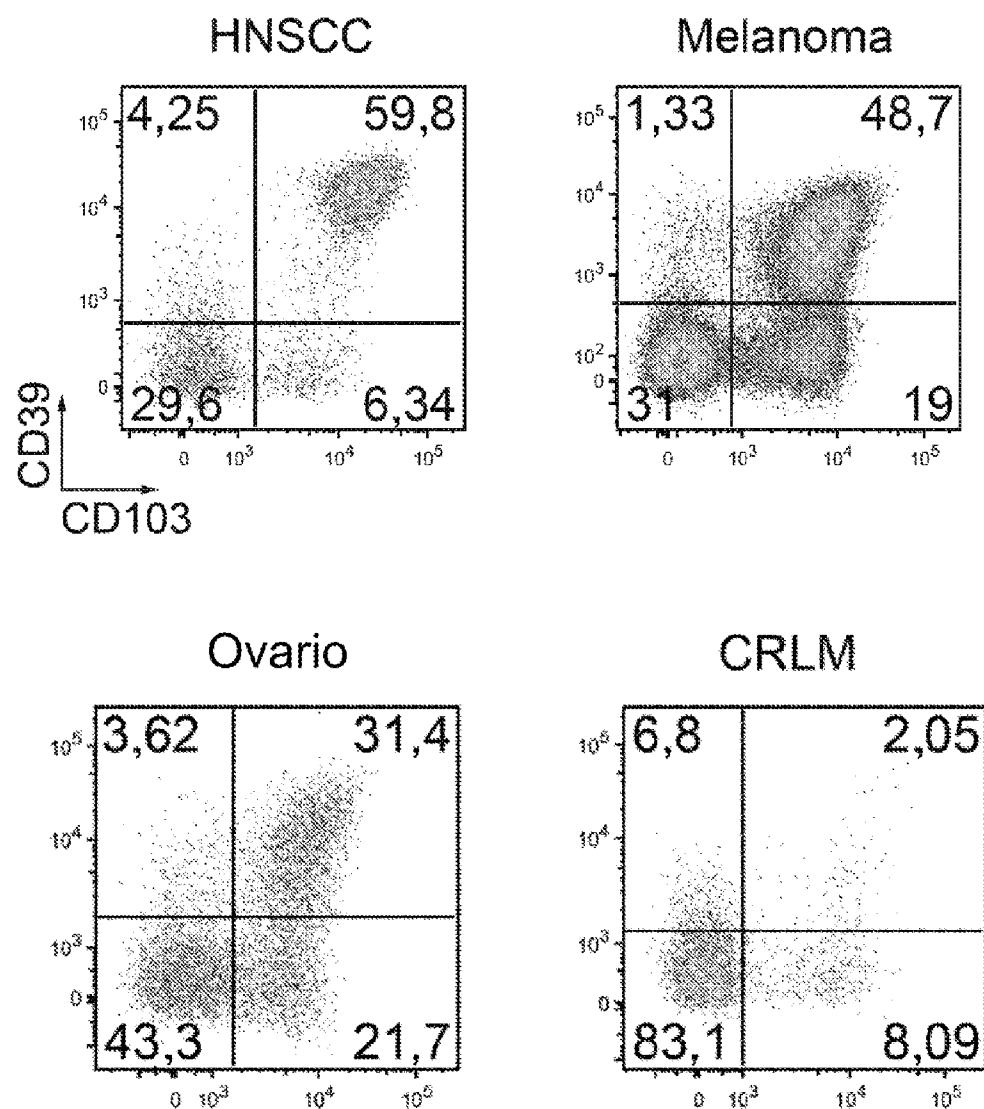
FIG. 1C

FIG. 1D

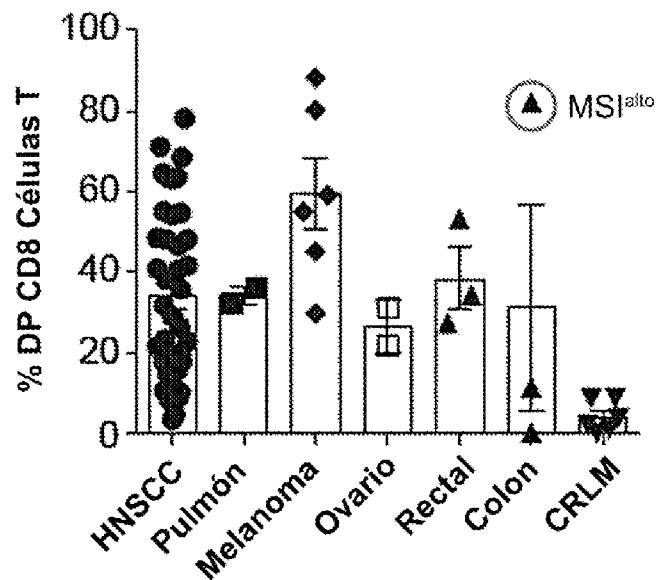


FIG. 1F

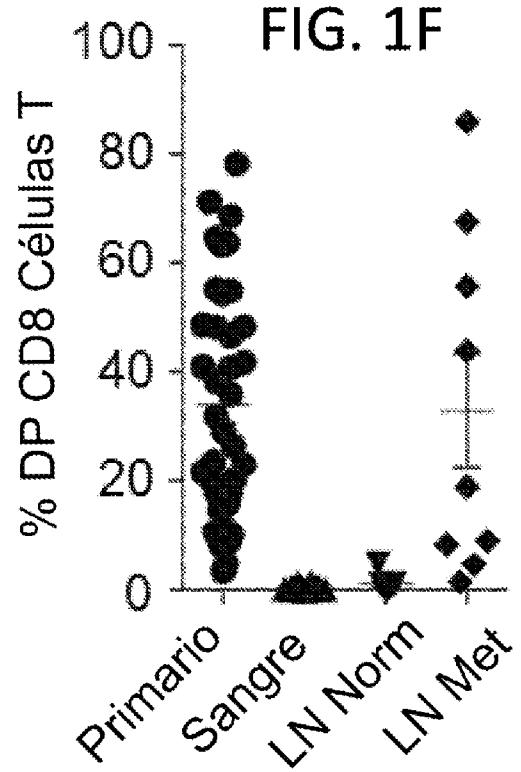


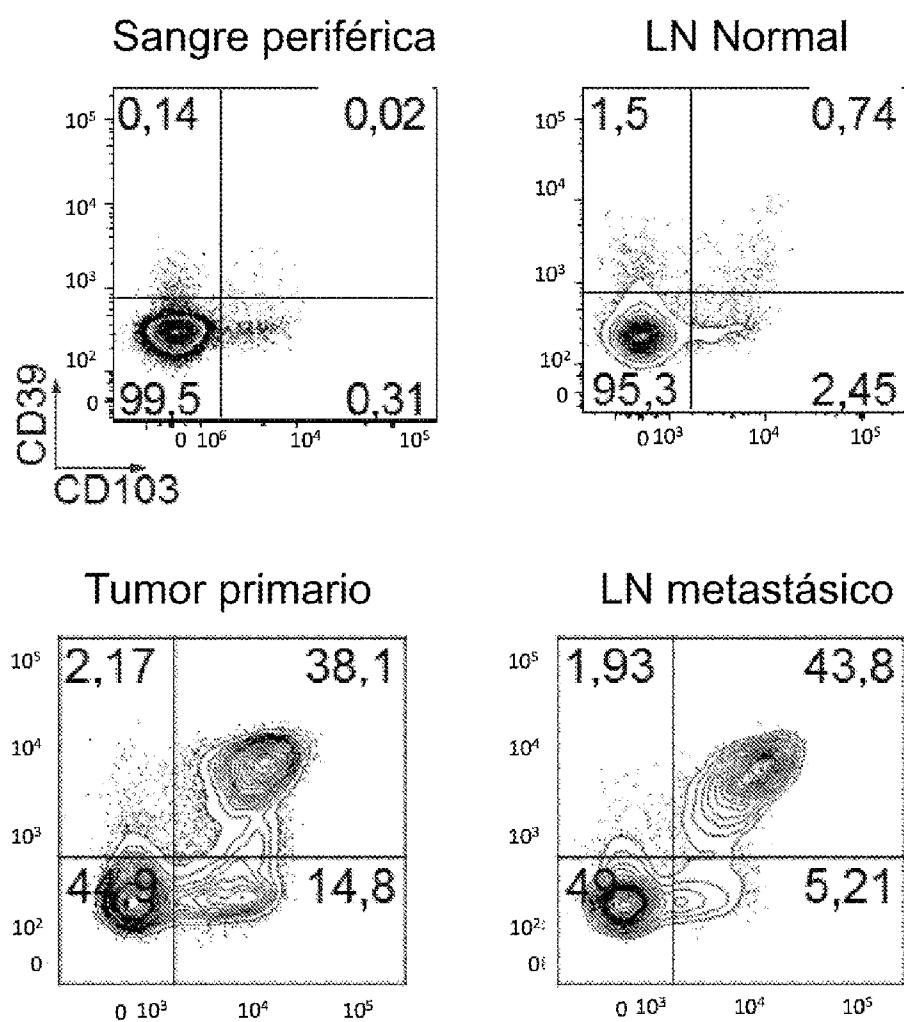
FIG. 1E

FIG. 2A

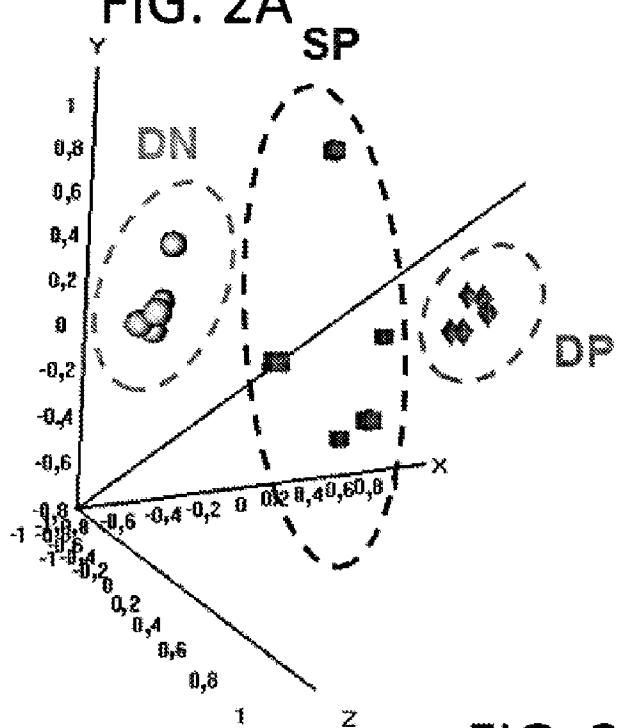
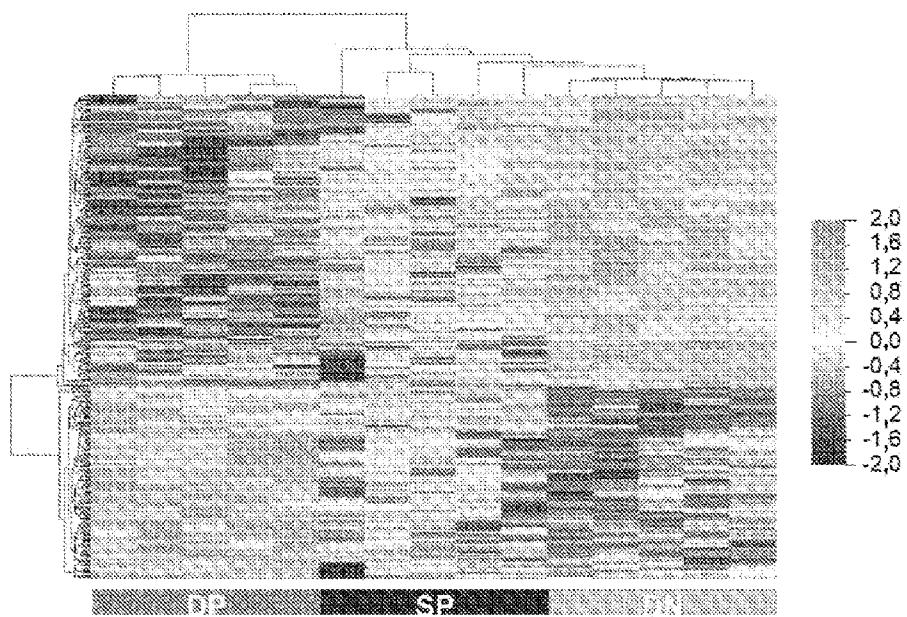


FIG. 2B



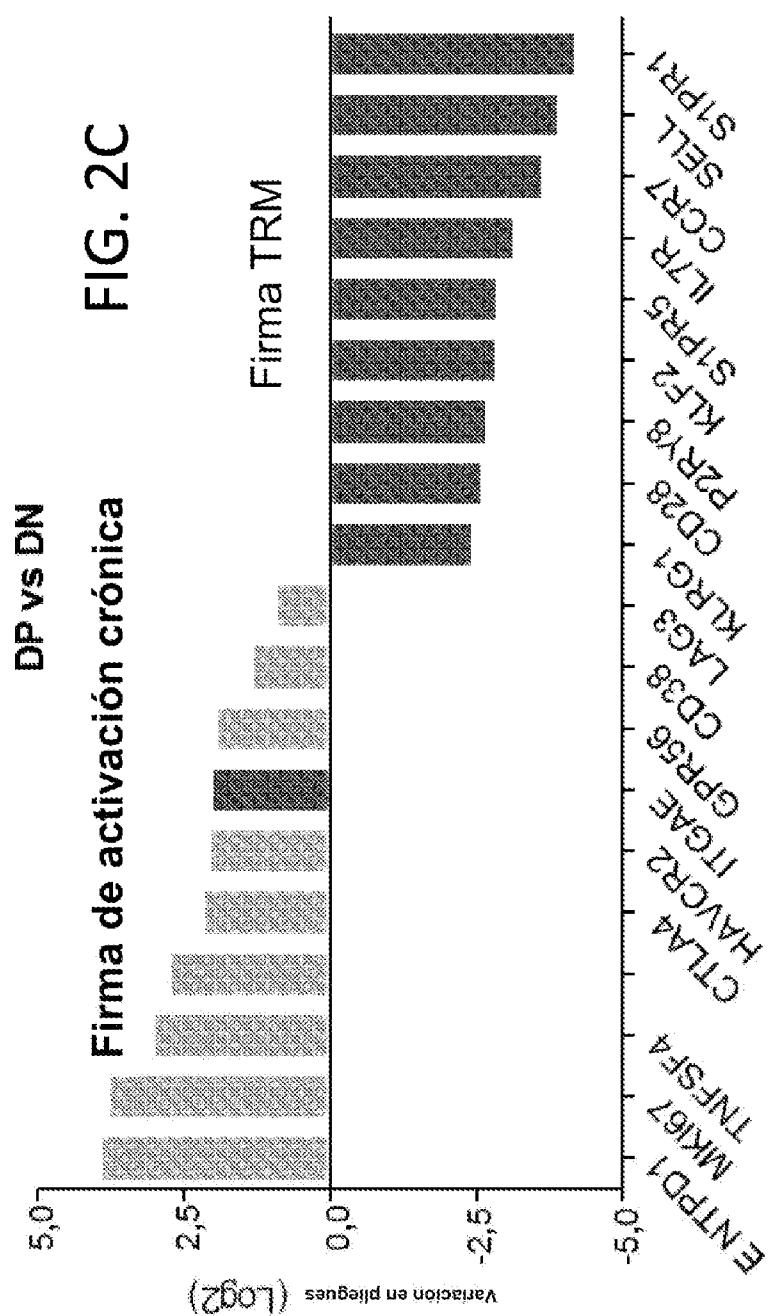


FIG. 2D

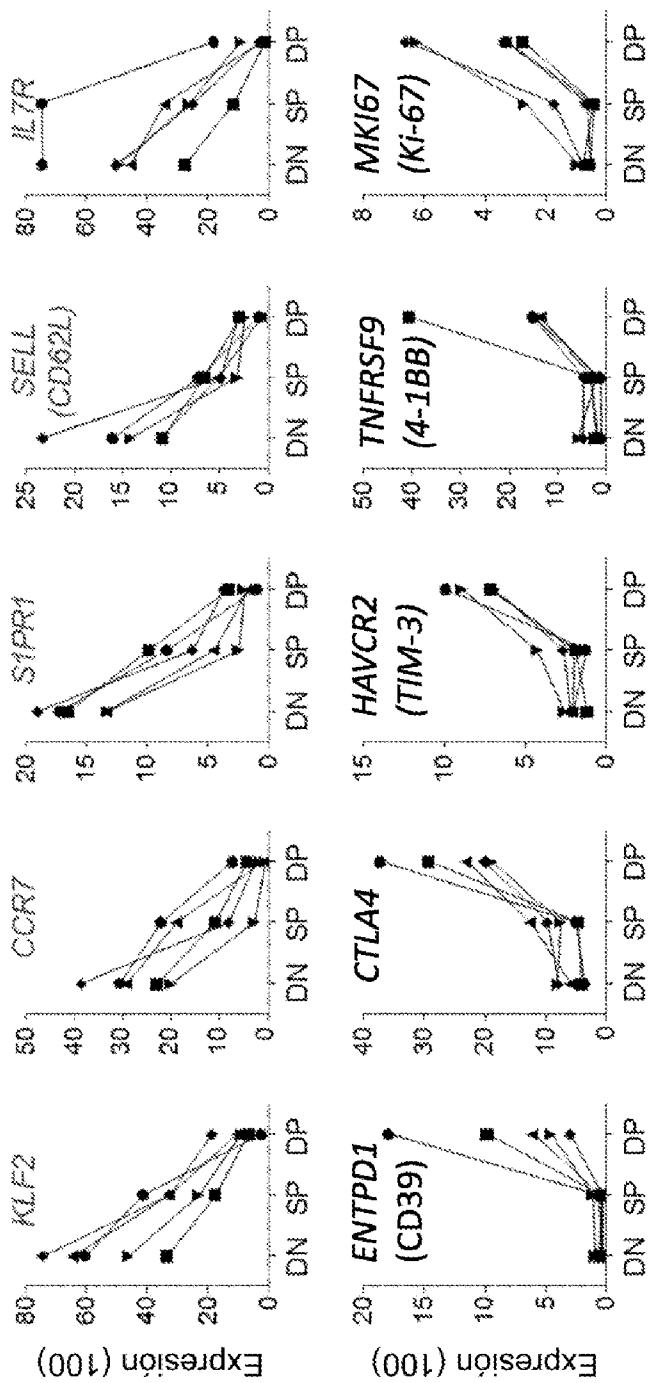


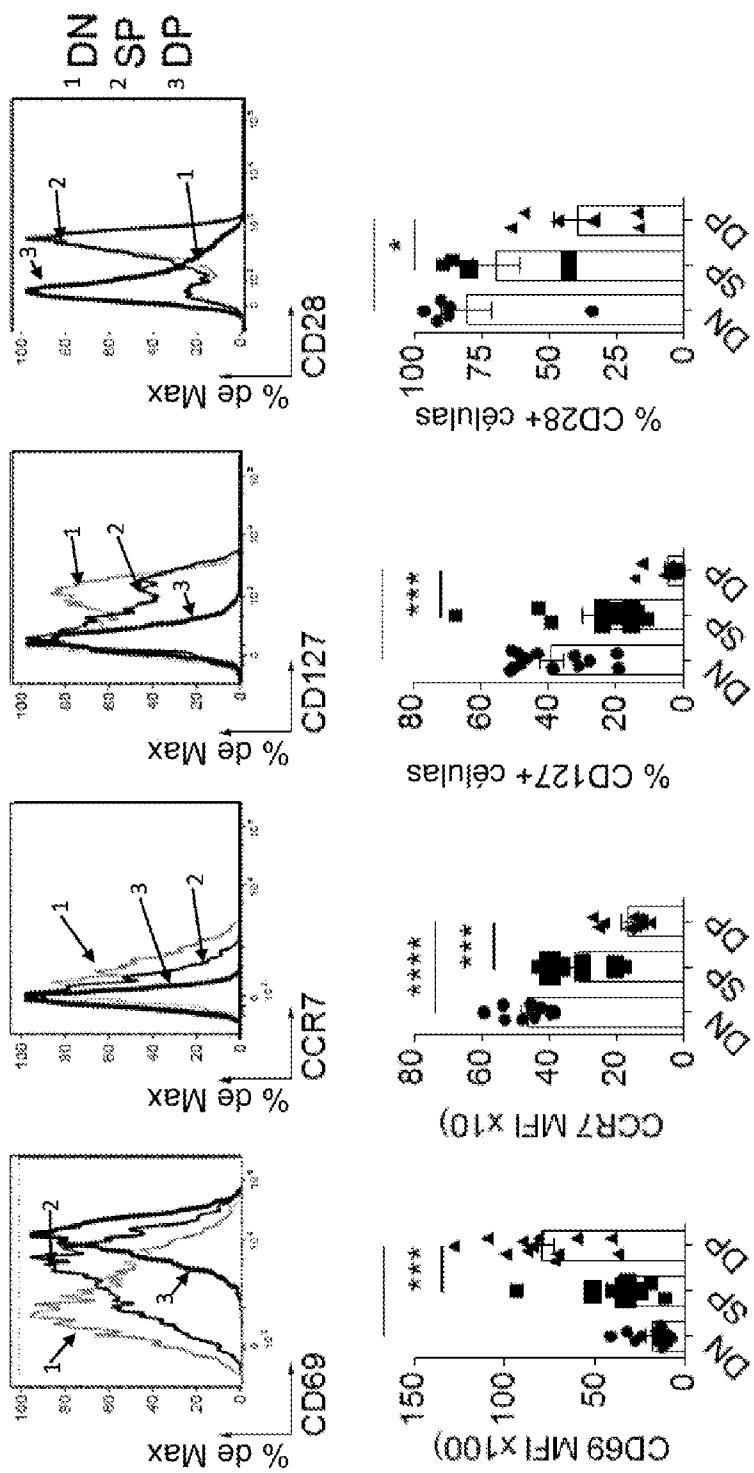
FIG. 3A

FIG. 3B

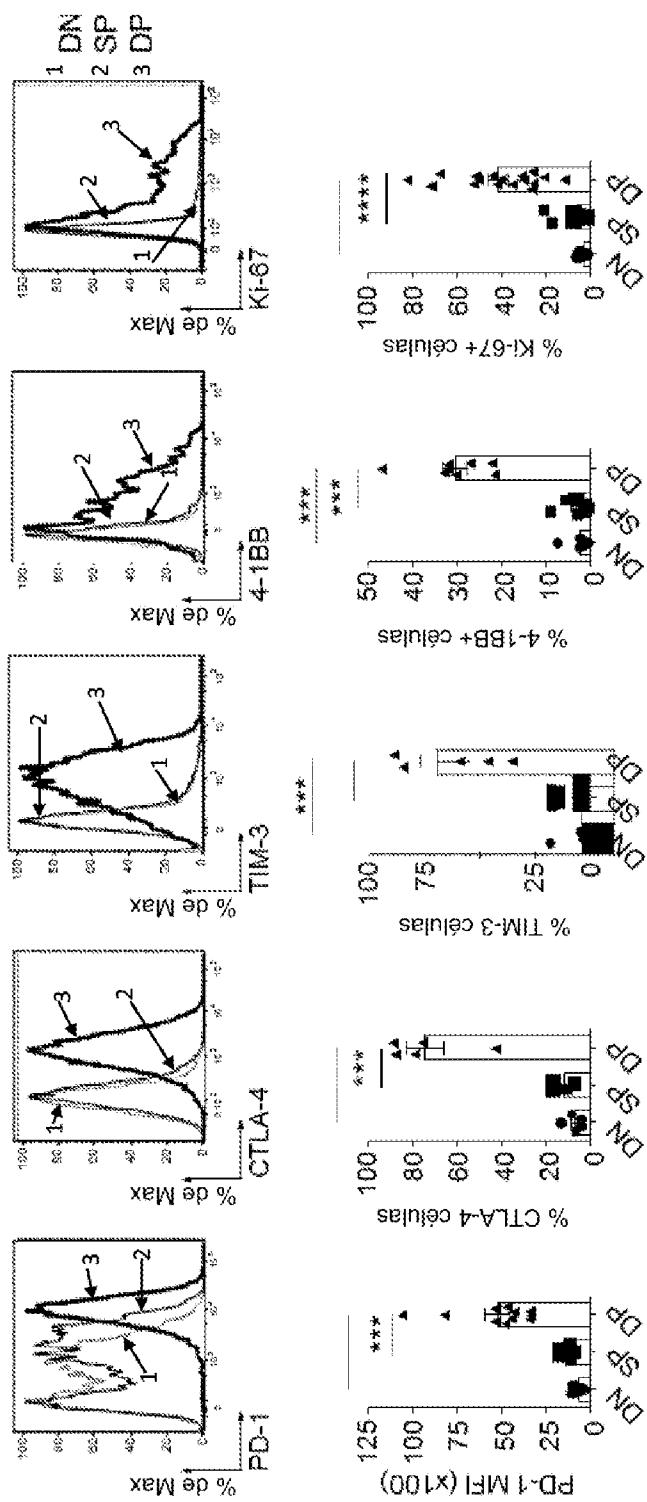


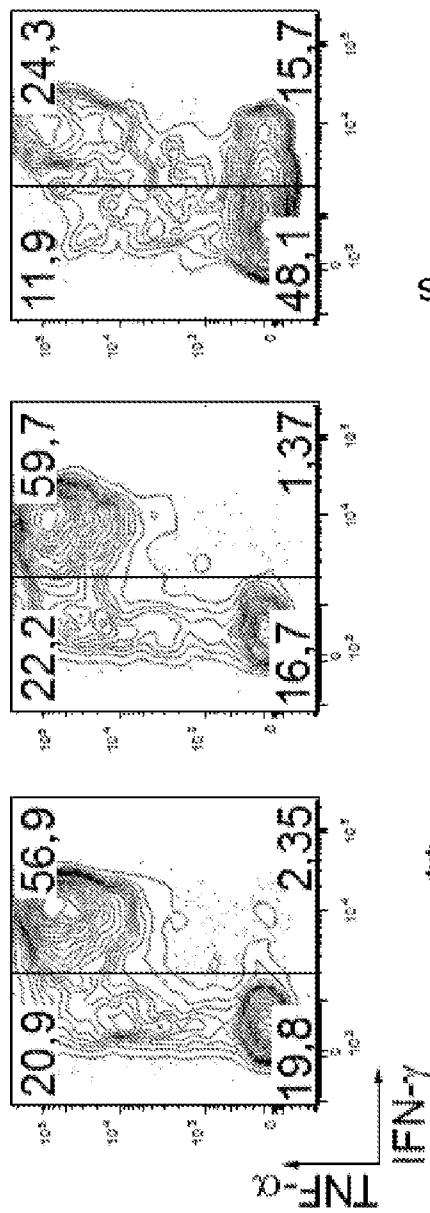
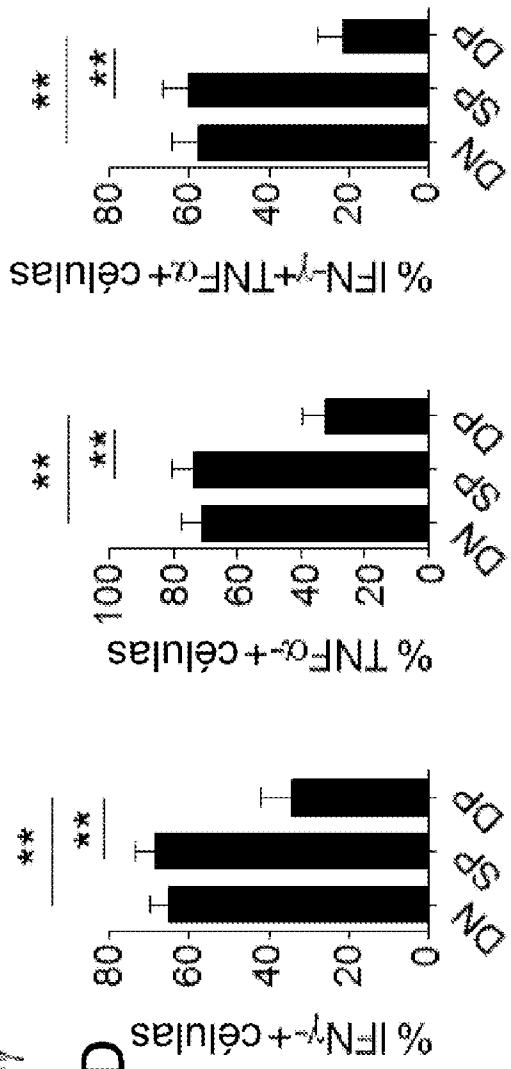
FIG. 3C DN SP DP**FIG. 3D**

FIG. 3E

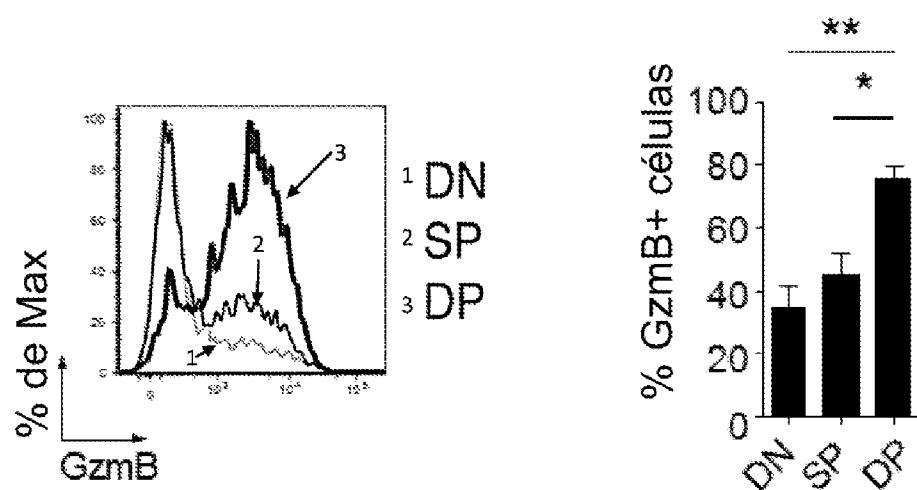


FIG. 4

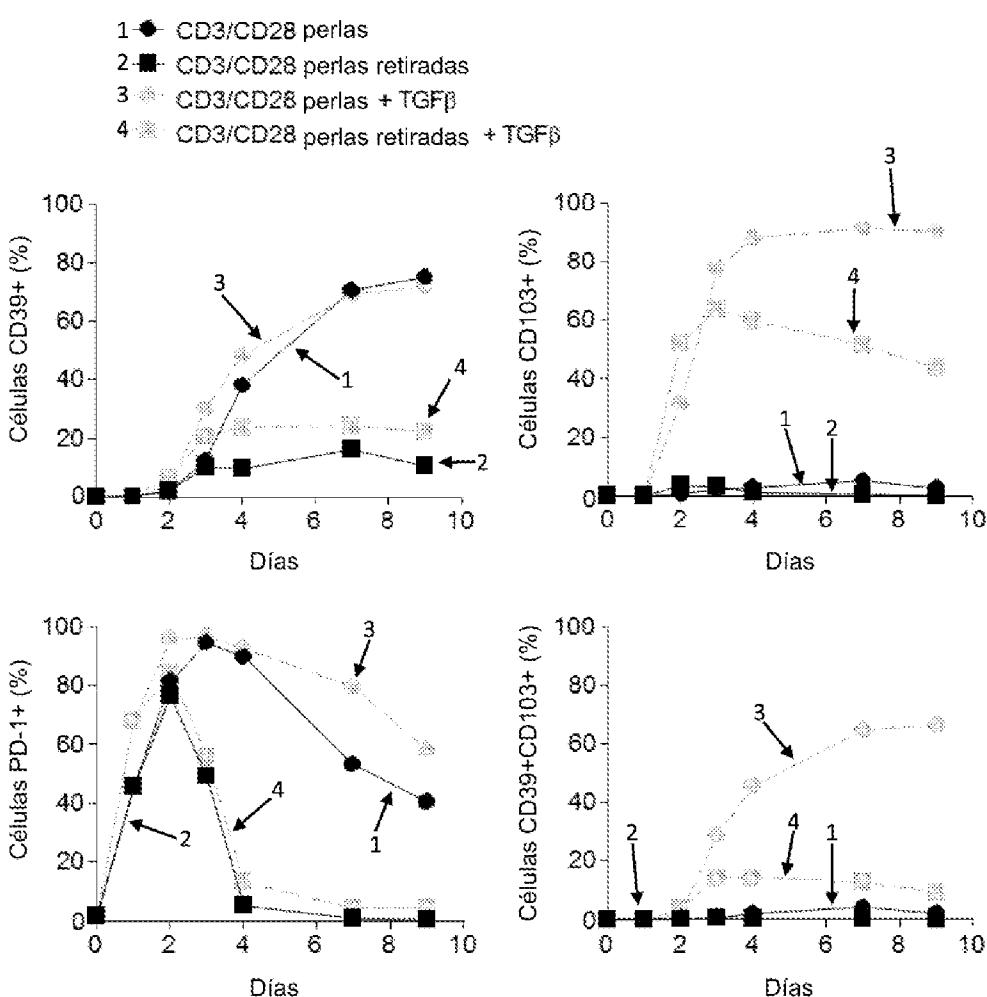


FIG. 5A

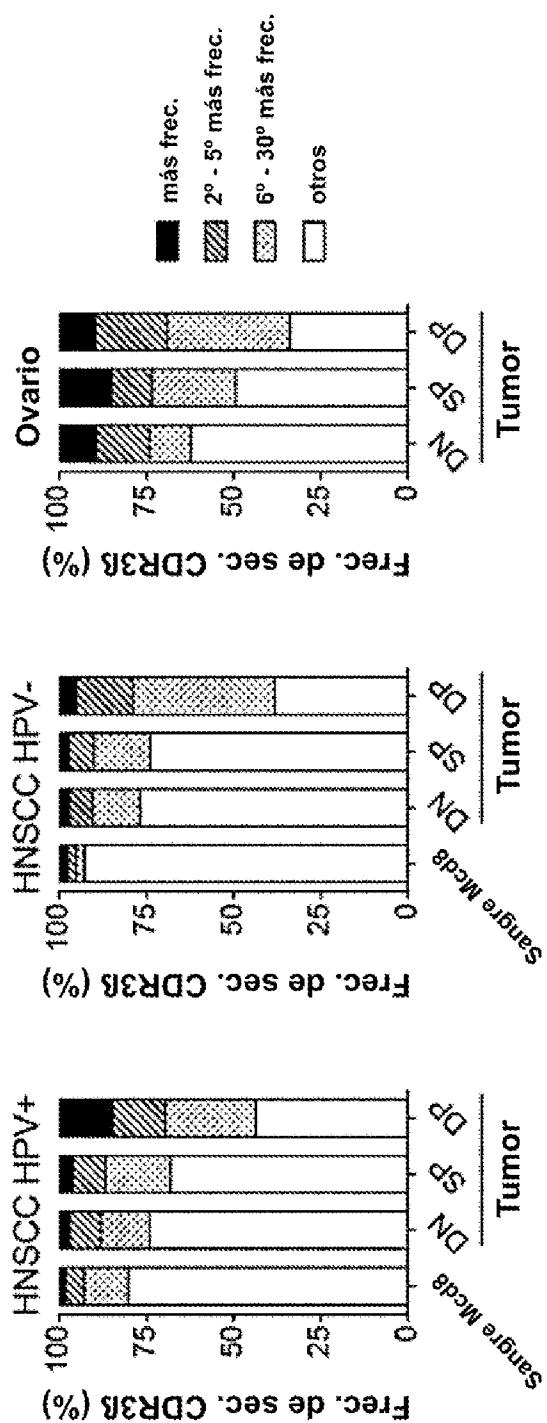


FIG. 5B

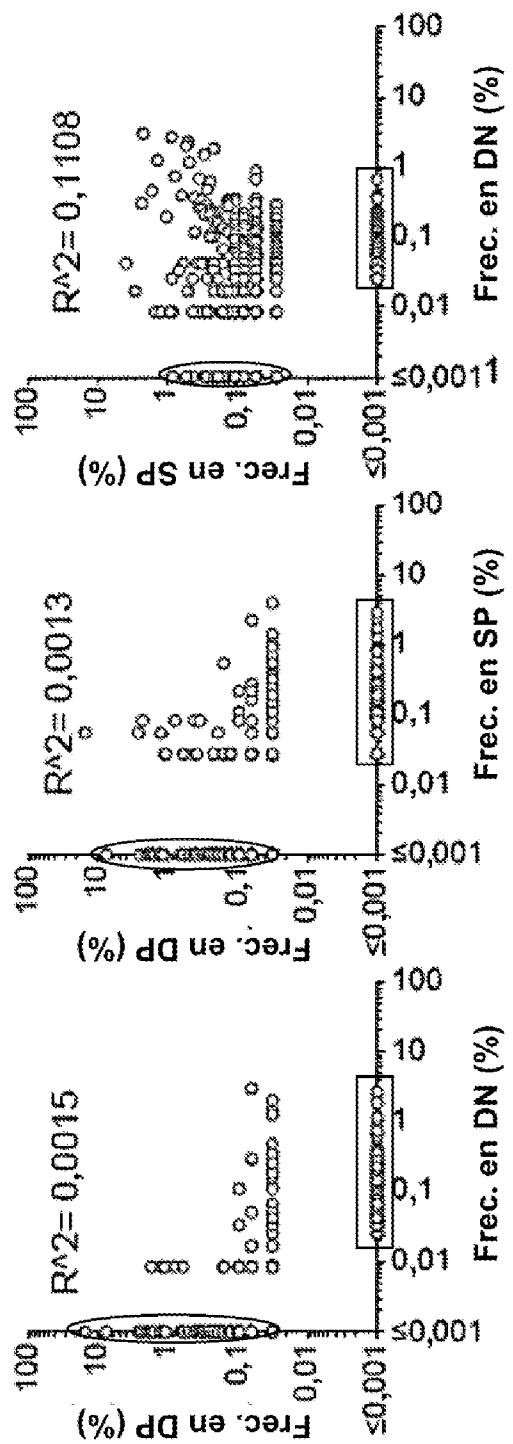


FIG. 5C

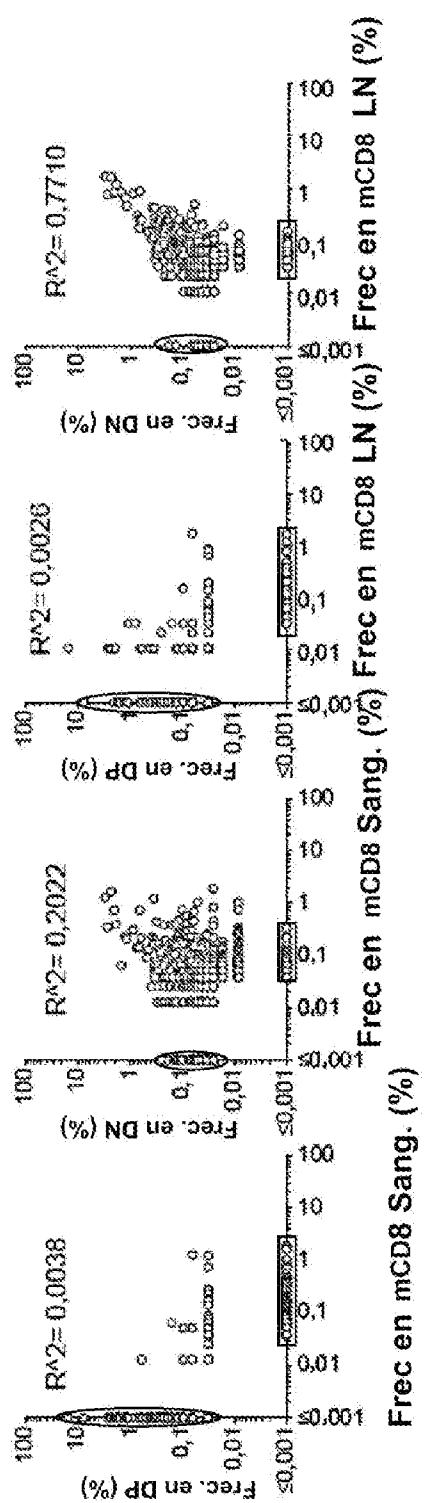


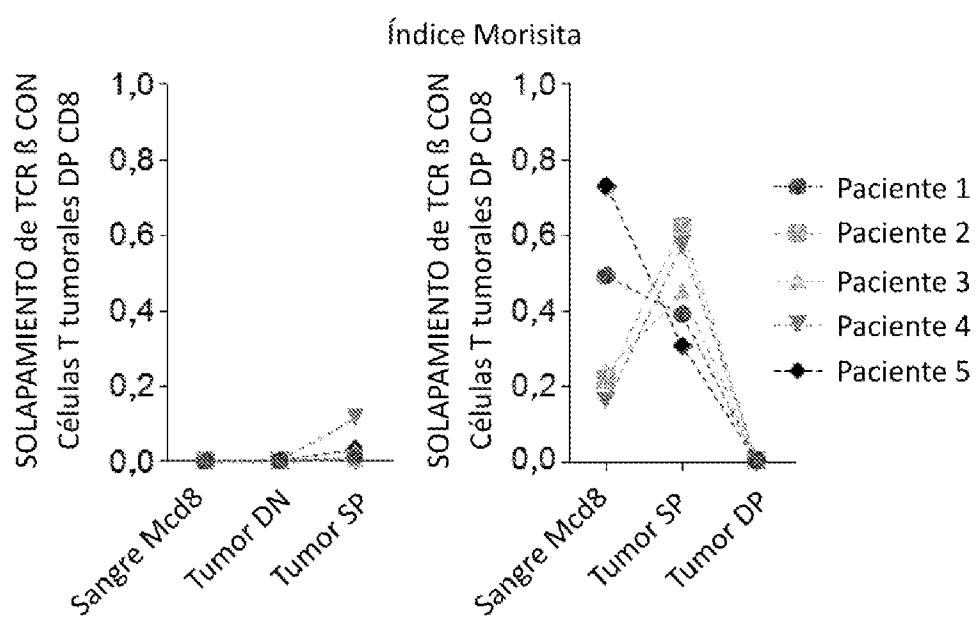
FIG. 5D

FIG. 6A

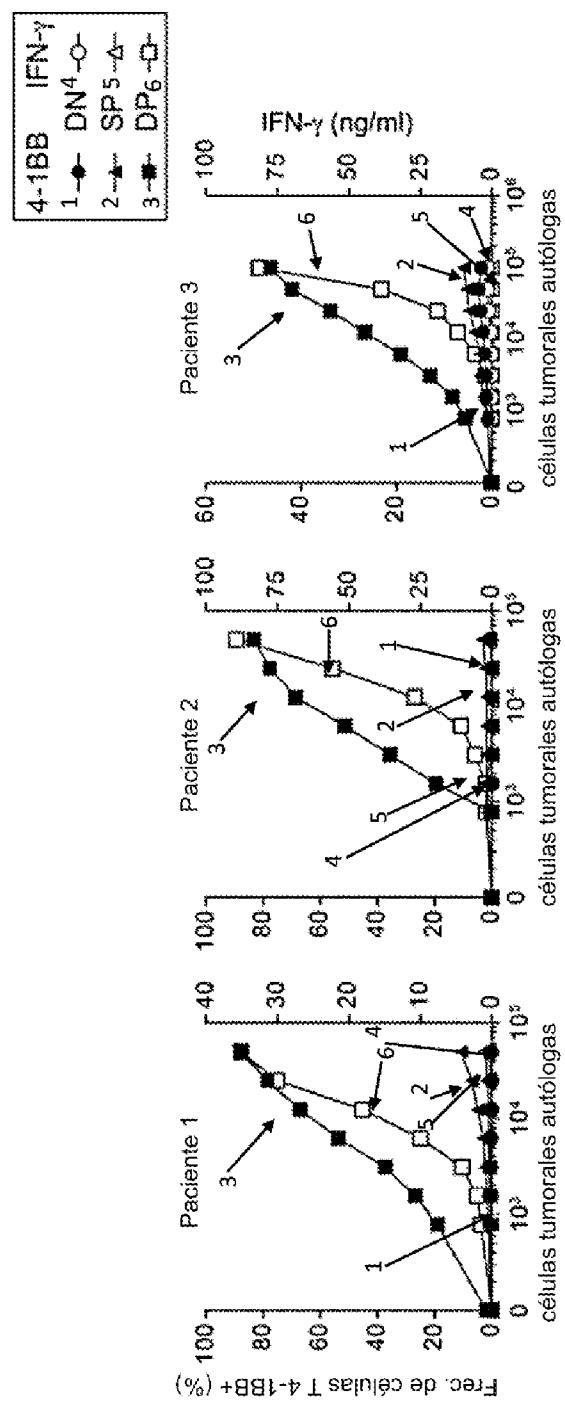


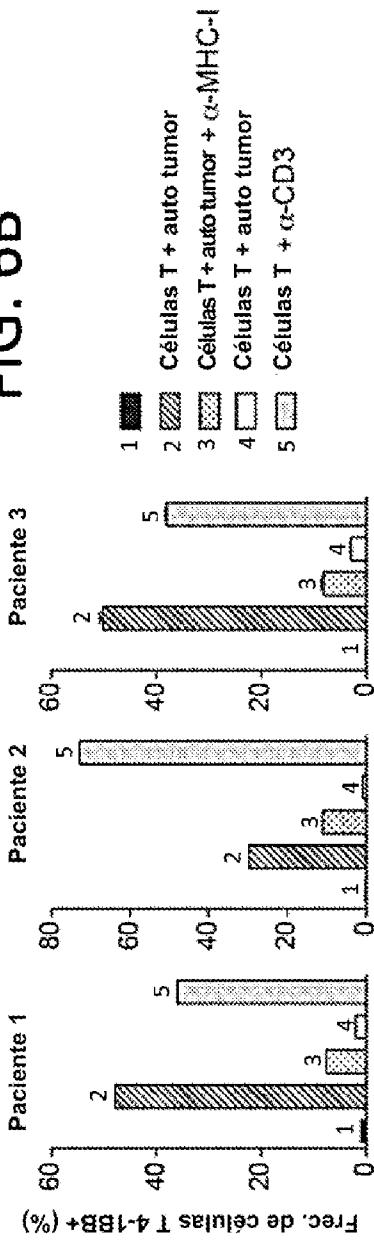
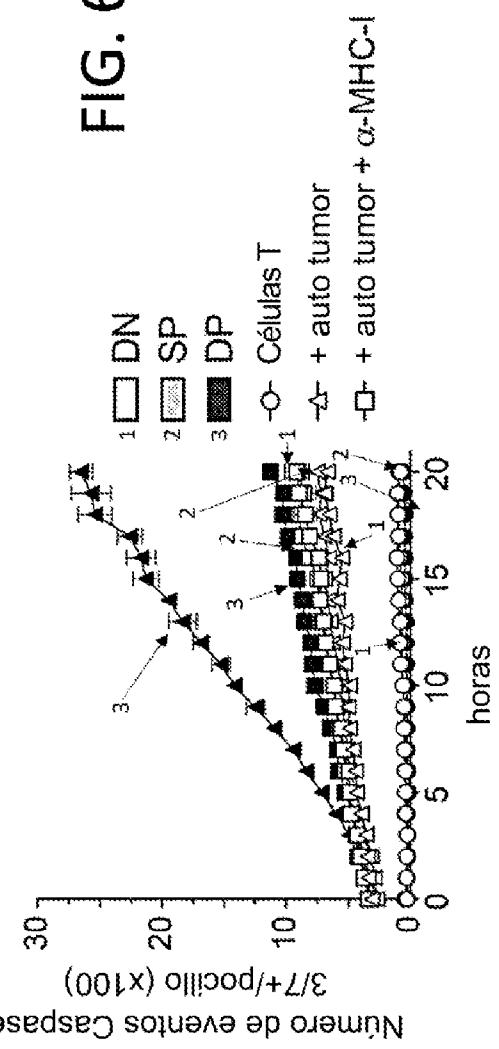
FIG. 6B**FIG. 6C**

FIG. 6D

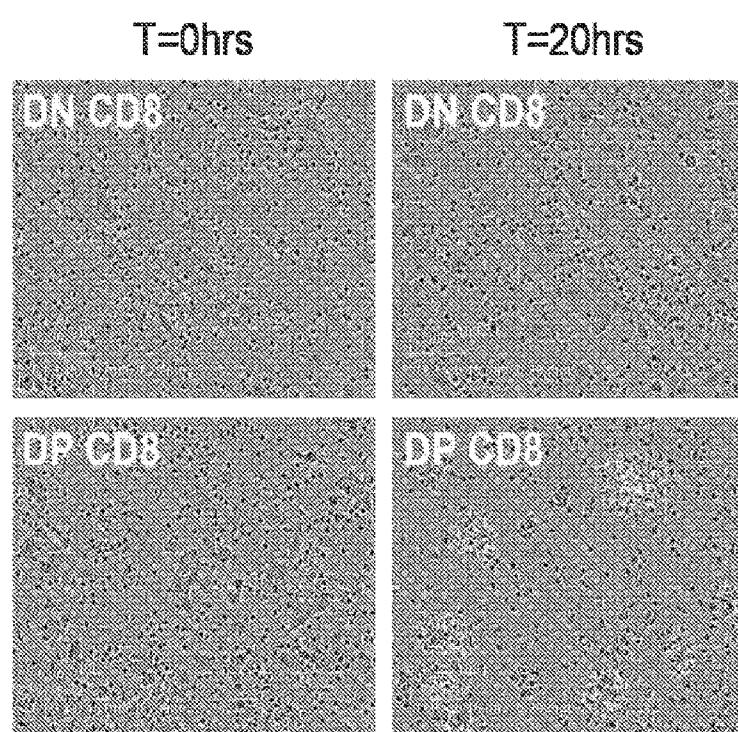


FIG. 6E

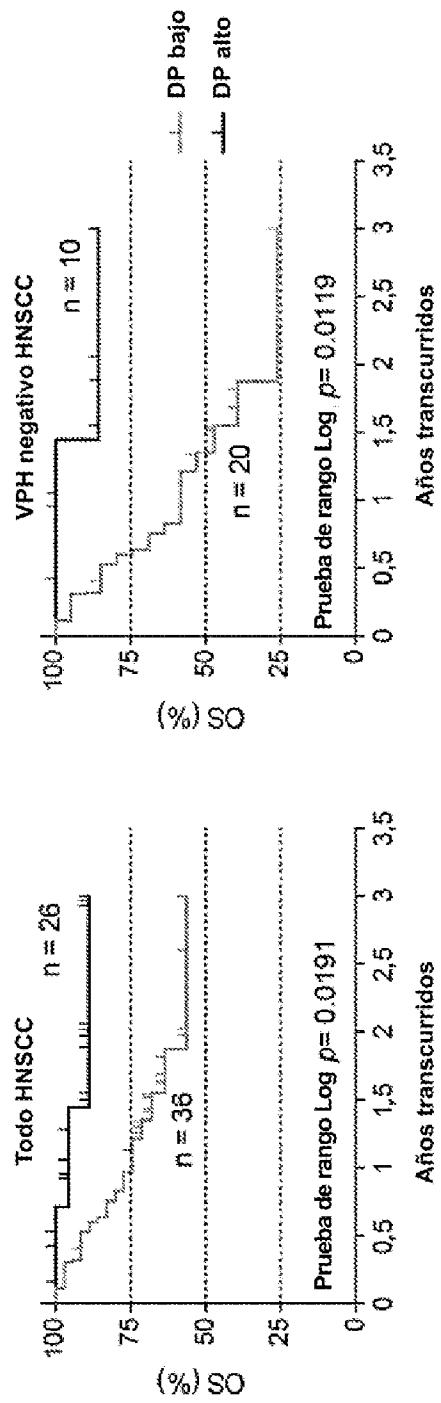


FIG. 7A

Frec. en DP CD8 TIL (% de clonotipos totales)		Región TCRB DCR3 (secuencia de nucleótidos)
Cocultivo previo	Tumor-reactivo	
4,584	6,141	CCGCTCAGGCTGGAGTTGGCTGCTCCCTCC CAGACATCTGTGTAATTCTGTGCCAGCAGT TGGGGTGGCGAGCAGTACTTCGGGCG
3,776	0,340	CTGAGCTCTGGAGCTGGGGACTCAGCT TTGTATTCCTGTGCCAGCAGCGGAGACAGTT AACACCGGGAGCTGTTTTGGAGAA
3,190	0,783	GAGTCCGCCAGCACCAACCAGACATCTATG TACCTCTGTGCCAGCAGTTCCGGGACAGG GGGCTTCAGCCCCAGCATTTGGTGTAT
3,111	1,463	ACGATCCACCGCACACAGCAGGAGGACTC GCCGTGTATCTGTGCCAGCAGCTCGAC AGGGGGCTACGAGCAGTACTTCGGGCG
2,932	4,316	CTGAGCTCTGGAGCTGGGGACTCAGCT TTGTATTCCTGTGCCAGCAGCTTGGACAG GGGGCCTACGAGCAGTACTTCGGGCG
2,697	0,095	CAGCGCACAGAGCAGGGGACTCGGCCAT GTATCTCTGTGCCAGCAGCAGGAGACAGC CGGGAACACTGAAGCTTCTTGACAA
2,568	11,506	CTGGAGTCGCCAGCACCAACCAGACATCT ATGTACCTCTGTGCCAGCAGTTAGCTAGA AACACCGGGAGCTGTTTTGGAGAA
2,237	3,949	AAGATCCACGCCCTGCAAAGCTTGAGGACTCG GCCGTGTATCTGTGCCAGCAGCACGACT AGTCAGATAACGAGTATTTGGCCA
2,099	0,047	CAGCGCACAGAGCAGGGGACTCGGCCAT GTATCGCTGTGCCAGCAGCAGGAGGCCG GGATCGATAAAAACTGTTTTTGGCAGT
2,025	0,905	GAGTCGCCAGCCCCAACCAGACCTCTCTG TACCTCTGTGCCAGCAGTCTCGGGGGATAT AGCAATCAGCCCCAGCATTTGGTGAT
1,939	1,388	ACTCTGACAGTGACCACTGCCATCCTGAA GACAGCAGCTTCTACATCTGCAGCGCTTGG ACAGGCTACGAGCAGTACTTCGGGCG
1,832	0,667	ATCCAGCGCACACAGCAGGAGGACTCCGC CGTGTATCTGTGCCAGCACCCAACTATTAA ATGATCAATGAGCAGTTCTCGGGCCA
1,825	4,146	CGCACAGAGCAGGGGACTCGGCCATGTA TCTCTGTGCCAGCAGTTATGGCCCCGGGAC AGTTAATGAAAAGCTTTTTGGCAGT
1,817	4,663	CTGGAGTCGGCTGCTCCCTCCAGACATCT GTGTACTCTGTGCCAGCAAGGGCCCCTT GGCGGAATGAGCAGTTCTCGGGCCA
1,651	1,280	ATCCAGCGCACAGAGCAGGGGACTCGGC CATGTATCTGTGCCAGCAGCTCGATTCT GGGGCGGGGACGAGTATTTGGCCA

FIG. 7B

Freq. en DP CD8 TIL (% de clonotipos totales)		Región TCRB DCR3 (secuencia de nucleótidos)
Cocultivo previo	Tumor-reactivo	
17,728	19,727	CGCACAGAGCAGGGGACTCGGCCATGTA TCTCTGTGCCAGCAGCCGCACTCAGGGTC GGGTAAGGAGCCCCAGCATTGGTGAT
6,919	16,125	TCTAAGAACGCTCTTCAGTGAECTCTGGCT TCTATCTCTGTGCCCTGGAGTGTGGGACTCC AGAACACTGAAGCTTCTTGACAA
5,381	2,651	CTGAGCTCTGGAGCTGGGGACTCAGCT TTGTATTTCTGTGCCAGCAGCGAAGGGTAT CCGTCAGAAAAACTGTTTTGGCACT
4,772	9,584	AAGATCCGGTCCACAAAGCTGGAGGACTCA GCCATGTACTTCTGTGCCAGAAACAGGGT AAGGGGAATGAGCAGTTCTCGGGCCA
4,462	7,023	CCGCTCAGGCTGGAGTTGGCTGCTCCCTCC CAGACATCTGTACTTCTGTGCCAGCAGT TGGGGTGGCGAGCAGTACTTCGGGCCG
3,537	0,050	ACTGTGACATCGGCCAAAAGAACCCGACA GCTTCTATCTGTGCCAGCAACCCAGGG TGGTACACTGAAGCTTCTTGACAA
3,518	0,021	ATCCAGCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCT GTGTACTTCTGTGCCAGCAGCCGGCGGG GTCTTACAATGAGCAGTTCTCGGGCCA
3,093	3,790	CAGCGCACAGAGCAGGGGACTCGGCCAT GTATCTGTGCCAGCAGCTCCCCGGGTAG CTCCCTACAATGAGCAGTTCTCGGGCCA
3,010	1,553	ATCAAATTCCCTGGAGCTTGGTACTCTGCT GTGTATTTCTGTGCCAGCAGCTTGGACAG GGGGCCTACGAGCAGTACTTCGGGCCG
3,007	6,393	AAGAAGCTCCTCTCACTGACTCTGGCTCT ATCTCTGTGCCCTTATACTAGTCGGGACAAT ACGAGAGACCCAGTACTTCGGGCCA
2,991	3,602	GAGTCGCCAGCCCCAACCAAGCACCTCTG TACTTCTGTGCCAGCAGTCTCGGGGATAT AGCAATCAGCCCCAGCATTGGTGAT
2,499	0,093	ACTGTGACATCGGCCAAAAGAACCCGACA GCTTCTATCTGTGCCAGTATTAGTGGGT GGGGCACTGAAGCTTCTTGACAA
2,398	0,058	CGCACAGAGCAGGGGACTCGGCCATGTA TCTCTGTGCCAGCAGTTATGGCCCCGGGAC AGTTAATGAAAAACTGTTTTGGCACT
2,368	0,114	GCCCCAAAAGAACCCGACAGCTTCTATCTC TGTGCCAGTAGTCCCCCCCCGACAGGGGTC GCGGCAAGAGACCCAGTACTTCGGGCCA
2,208	7,404	CTAAACCTGAGCTCTGGAGCTGGGGGAC TCAGCTTGTATTCGTGCCAGCAGCGGA CAGGGGGCGAAGCAGTACTTCGGGCCG

FIG. 7C

