

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 910 709**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0783** (2010.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**A61K 31/495** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2016 PCT/US2016/050428**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17041106**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2016 E 16843195 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.01.2022 EP 3344760**

54 Título: **Células T modificadas genéticamente resistentes a fármacos y procedimientos de utilización de las mismas**

30 Prioridad:

**03.09.2015 US 201562214071 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.05.2022**

73 Titular/es:

**THE UAB RESEARCH FOUNDATION (33.3%)  
1720 2nd Avenue South Administration Building  
770  
Birmingham, AL 35294-0107, US;  
EMORY UNIVERSITY (33.3%) y  
CHILDREN'S HEALTHCARE OF ATLANTA, INC.  
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**LAMB, LAWRENCE S.;  
SPENCER, H. TRENT y  
GILLESPIE, G. YANCEY**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 910 709 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 modificadas genéticamente resistentes a fármacos y procedimientos de utilización de las mismas

## 5 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las estrategias de tratamiento convencionales para el tratamiento de cánceres, aunque prometedoras en muchos aspectos, aún necesitan mejoras. Por ejemplo, a pesar de grandes esfuerzos, las terapias de tratamiento para los tumores cerebrales primarios de alto grado, tales como el *glioblastoma multiforme* (GBM), no han logrado extender de manera significativa y consistente la mediana de supervivencia más allá de los dos años.

Un área de investigación que se está investigando es la inmunoterapia (29). Estos tratamientos utilizan el poder del sistema inmunitario de los pacientes para combatir enfermedades, tales como el cáncer. En particular, se está explorando la transferencia adoptiva de células. En muchas formas de la transferencia adoptiva de células, las células inmunitarias del paciente se recogen, expanden y modifican para una respuesta más eficaz. A este respecto, se han utilizado receptores de antígenos quiméricos (CAR). Los CAR son receptores modificados que injertan una especificidad arbitraria y definida en una célula efectora inmunitaria. Habitualmente, los CAR se utilizan para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal en una célula T. En este enfoque, las células T se extraen de un paciente o de un donante adecuado y se modifican para que expresen receptores específicos para la forma particular de cáncer. Las células T, que, a continuación, pueden reconocer y destruir las células cancerosas, se reintroducen en el paciente. Los estudios clínicos iniciales de este enfoque han demostrado su eficacia.

Sin embargo, la utilización de CAR en la transferencia adoptiva de células todavía presenta varios inconvenientes.

En los intentos por combinar la inmunoterapia con la quimioterapia, la Patente WO2014/164554 A1 da a conocer células T CAR resistentes a la temozolomida, mientras que Lamb et al. (4) da a conocer células T  $\gamma\delta$  resistentes.

La presente divulgación da a conocer una nueva composición de células del sistema inmunitario que se modifica para expresar un CAR específico para un antígeno tumoral, un receptor para un antígeno inducido por estrés y un factor de supervivencia que proporciona resistencia a un tratamiento terapéutico adicional (tal como un régimen de tratamiento de quimioterapia) que se puede administrar al paciente. La composición celular puede incluir, además, un gen suicida y elementos adicionales. También se dan a conocer procedimientos para utilizar las composiciones celulares para el tratamiento de una enfermedad. Por tanto, la presente divulgación da a conocer soluciones nuevas y necesarias a los problemas del tratamiento utilizando inmunoterapia. Las composiciones celulares proporcionadas son células T  $\gamma\delta$ .

## DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La figura 1A muestra un vector de control de CAR de EGFRvIII que expresa conjuntamente eGFP, que se puede utilizar para rastrear fácilmente la transducción celular mediante citometría de flujo.

La figura 1B muestra un vector de control de CAR de EGFRvIII que expresa conjuntamente luciferasa de luciérnaga, que se puede utilizar para rastrear la migración/localización de células *in vivo*.

La figura 1C muestra un vector de control que codifica el CAR de EGFRvIII, que carece de secuencias que codifican un factor de supervivencia y no puede conferir resistencia a fármacos. La construcción de control se puede utilizar como control positivo para la expresión de CAR y como control negativo para la resistencia a fármacos.

La figura 1D muestra un CAR de EGFRvIII que expresa conjuntamente secuencias que codifican un factor de supervivencia (en esta figura MGMT) que confiere resistencia a la temozolomida (TMZ). Se anticipa que esta construcción proporciona el mayor beneficio para el tratamiento *in vivo* del glioblastoma.

La figura 2 muestra un diseño experimental de ejemplo para el tratamiento.

La figura 3A muestra imágenes fusionadas de SPECT/CT (*vista axial*) que muestran la distribución de células T  $\gamma\delta$  marcadas con  $^{111}\text{In}$  en tumores de almohadilla de grasa mamaria 4T1 a las 48 horas después de la inyección realizada utilizando células T  $\gamma\delta$  que no fueron tratadas e ilustra que las células T  $\gamma\delta$  no tratadas se unieron al tumor; el círculo punteado delimita la región del tumor.

La figura 3B muestra la misma formación de imágenes descrita en la figura 3A realizada utilizando células T  $\gamma\delta$  que fueron pretratadas con un anticuerpo monoclonal contra TCR  $\gamma\delta$  antes de la inyección e ilustra que las células T  $\gamma\delta$  tratadas no se unieron al tumor; el círculo punteado delimita la región del tumor.

La figura 4A muestra la expresión de NKG2DL asociada al estrés en los xenoinjertos de glioma X12T y X22T. Ambos tipos de células mostraron autofluorescencia. Negro = control de isotipo, azul = tumor, rojo = tumor expuesto a TMZ 400  $\mu\text{M}$  durante 4 horas.

La figura 4B muestra que las células T  $\gamma\delta$  expandidas/activadas *ex vivo* modificadas para ser resistentes a TMZ eran citotóxicas para las células derivadas de los xenoinjertos de glioma X12T y X22T cultivadas *in vitro* con proporciones efector:diana (E:D) crecientes de X12T y X22T y el % de lisis expresado como la proporción de vivos/muertos mediante citometría de flujo.

La figura 5A muestra la supervivencia de ratones portadores del glioma X12P después del tratamiento con TMZ sola (TMZ), con la combinación de TMZ más una composición que comprende células T  $\gamma\delta$  y células NK modificadas para

expresar un factor de supervivencia para la resistencia a TMZ (DRI), con células T  $\gamma\delta$  no modificadas y células NK (CT) y en ratones de control que no recibieron tratamiento.

La figura 5B muestra la supervivencia de ratones portadores del glioma X12T después del tratamiento con TMZ sola (TMZ), con la combinación de TMZ más una composición que comprende células T  $\gamma\delta$  y células NK modificadas para expresar un factor de supervivencia para la resistencia a TMZ (DRI), con células T  $\gamma\delta$  no modificadas y células NK (CT) y en ratones de control que no recibieron tratamiento.

La figura 6 muestra que la expresión del antígeno inducido por estrés no aumenta en tejido cerebral normal adyacente al tejido de tumor cerebral metastásico.

La figura 7 muestra que la expresión del antígeno inducido por estrés no aumenta en el tejido cerebral normal después del tratamiento con radiación.

La figura 8A muestra una realización de los procedimientos de la técnica anterior.

La figura 8B muestra una realización de los procedimientos de la presente divulgación.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las estrategias de tratamiento convencionales para los cánceres necesitan mejoras. La presente divulgación da a conocer una solución novedosa a los problemas encontrados en la técnica y describe composiciones celulares novedosas y procedimientos para utilizar las composiciones celulares novedosas para el tratamiento de una variedad de cánceres, que incluyen, pero sin limitarse al mismo, GBM. La presente divulgación da a conocer ejemplos de composiciones celulares que utilizan células T  $\gamma\delta$  y da a conocer ejemplos específicos de CAR y factores de supervivencia. Sin embargo, con la presente divulgación se pueden utilizar otros CAR y otros factores de supervivencia. La elección del CAR y el factor de supervivencia puede estar influida, como mínimo, en parte, por el tipo de cáncer a tratar y las terapias adicionales utilizadas en el tratamiento del paciente.

La presente divulgación da a conocer composiciones celulares novedosas y utilidades de dichas composiciones celulares en procedimientos de tratamiento.

La presente invención reivindicada es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

### Composiciones celulares

En general, la presente divulgación utiliza un factor de supervivencia para proporcionar inmunoterapia celular resistente a fármacos (DRI). A través de este mecanismo, se proporciona a las composiciones celulares de la presente divulgación la capacidad de sobrevivir, expandirse y ejercer actividad antitumoral en un entorno de tratamiento después de la administración al sujeto. El factor de supervivencia se selecciona en base a un tratamiento terapéutico adicional que puede utilizarse en combinación con las composiciones celulares y los procedimientos de la presente divulgación.

Tal como se utiliza en el presente documento, la frase “sobrevivir en un entorno de tratamiento creado por un tratamiento terapéutico adicional” se puede utilizar indistintamente con la frase “sobrevivir en presencia de un tratamiento terapéutico adicional” y cada frase se refiere a la capacidad de una célula para sobrevivir en contacto directo con un agente utilizado en el tratamiento terapéutico adicional o para sobrevivir en presencia de toxicidad celular en el entorno de las composiciones celulares de la presente invención resultante de la utilización de un agente terapéutico adicional. Entre los tratamientos terapéuticos adicionales se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, el tratamiento con: agentes contra el cáncer, antagonistas metabólicos, agentes desmetilantes del ADN, agentes antitumorales derivados de plantas, fármacos para quimioterapia de análogos de nucleósidos/nucleótidos, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos contra el cáncer, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores mitóticos, agentes diferenciadores, agentes de terapia hormonal y combinaciones de los anteriores. Se puede utilizar una variedad de agentes específicos en los tratamientos terapéuticos adicionales, tal como se conoce en la técnica y, tal como se describe en el presente documento.

En una realización, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  que expresan, como mínimo, un CAR dirigido a un antígeno tumoral, un receptor para un antígeno inducido por estrés y un factor de supervivencia que permite que las células T  $\gamma\delta$  sobrevivan en un entorno de tratamiento creado por un tratamiento terapéutico adicional. Por ejemplo, el factor de supervivencia puede ser un polipéptido que confiere resistencia a uno o más agentes de quimioterapia que se utiliza junto con las composiciones celulares descritas. Entre dichos polipéptidos que confieren resistencia a fármacos para determinados agentes quimioterapéuticos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos: MGMT, 5' nucleotidasa II (NT5C2), una variante resistente a fármacos de la dihidrofolato reductasa (L22Y-DHFR), timidilato sintasa y proteína-1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR1).

En otra realización, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar, como mínimo, un CAR dirigido a un TAA específico de glioma, un receptor para un antígeno inducido por estrés y un factor de supervivencia que permite que las células T  $\gamma\delta$  sobrevivan en un entorno de tratamiento creado por un tratamiento terapéutico adicional (por ejemplo, un polipéptido que confiere resistencia a uno o más agentes de quimioterapia que se utiliza junto con las composiciones celulares descritas).

5 En otra realización, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar, como mínimo, un CAR dirigido a un TAA, un receptor para un antígeno inducido por estrés y un factor de supervivencia para la resistencia, por ejemplo, a quimioterapia con TMZ, que permite que las células T  $\gamma\delta$  sobrevivan, por ejemplo, en un entorno de tratamiento de quimioterapia con TMZ.

10 En otra realización, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar, como mínimo, un CAR dirigido al TAA específico de glioma EGFRvIII, un receptor para un antígeno inducido por estrés y MGMT para la resistencia, por ejemplo, a la quimioterapia con TMZ, que permite que las células T  $\gamma\delta$  sobrevivan, por ejemplo, en un entorno de tratamiento de quimioterapia con TMZ.

15 En otra realización, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar, como mínimo, un CAR dirigido al TAA específico de glioma IL13R $\alpha$ , un receptor para un antígeno inducido por estrés y MGMT para la resistencia, por ejemplo, a la quimioterapia con TMZ, que permite que las células T  $\gamma\delta$  sobrevivan, por ejemplo, en un entorno de tratamiento de quimioterapia con TMZ.

20 En otra realización, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar, como mínimo, un CAR dirigido a un TAA específico de neuroblastoma, un receptor para un antígeno inducido por estrés y un factor de supervivencia, que permite que las células T  $\gamma\delta$  sobrevivan en un entorno de tratamiento creado por un tratamiento terapéutico adicional (por ejemplo, un polipéptido que confiere resistencia a uno o más agentes de quimioterapia que se utiliza junto con las composiciones celulares descritas).

25 En otra realización, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar, como mínimo, un CAR dirigido a un TAA específico de neuroblastoma, un receptor para un antígeno inducido por estrés y un factor de supervivencia para la resistencia, por ejemplo, a quimioterapia con TMZ, que permite que las células T  $\gamma\delta$  sobrevivan, por ejemplo, en un entorno de tratamiento de quimioterapia con TMZ.

30 En otra realización, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar, como mínimo, un CAR dirigido al TAA específico de neuroblastoma GD2, un receptor para un antígeno inducido por estrés y el gen de O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) para la resistencia, por ejemplo, a quimioterapia con TMZ, que permite que las células T  $\gamma\delta$  sobrevivan, por ejemplo, en un entorno de tratamiento de quimioterapia con TMZ.

35 En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar solo un CAR dirigido a un antígeno tumoral, un TAA específico de glioma o un TAA específico de neuroblastoma, un receptor para un antígeno inducido por estrés, un gen suicida y un factor de supervivencia, tal como un factor de supervivencia para la resistencia, por ejemplo, a TMZ. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar solo un CAR dirigido a un antígeno tumoral, un TAA específico de glioma o un TAA específico de neuroblastoma, un receptor NKG2D y un factor de supervivencia, tal como un factor de supervivencia para la resistencia, por ejemplo, a TMZ. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar solo un CAR dirigido a un antígeno tumoral, un TAA específico de glioma o un TAA específico de neuroblastoma, un receptor NKG2D, un gen suicida y un factor de supervivencia, tal como un factor de supervivencia para la resistencia a TMZ.

45 Las células T  $\gamma\delta$  comprenden un receptor para un antígeno inducido por estrés. En determinadas realizaciones, las células T  $\gamma\delta$  comprenden un receptor NKG2D. En determinadas realizaciones, el receptor para un antígeno inducido por estrés o el receptor NKG2D están presentes de forma natural en las células T  $\gamma\delta$ . En determinadas realizaciones, el receptor para un antígeno inducido por estrés o el receptor NKG2D se inducen hasta un nivel aumentado en las células T  $\gamma\delta$ .

50 Las células del sistema inmunitario son cualquier célula del sistema inmunitario útil en inmunoterapia. En otro aspecto de lo anterior, las células del sistema inmunitario son cualquier célula que exprese un receptor para un antígeno inducido por estrés. En determinadas realizaciones, las células del sistema inmunitario son cualquier célula que exprese el receptor NKG2D. En determinadas realizaciones, las células del sistema inmunitario son células NK o células T  $\gamma\delta$ . En determinadas realizaciones, las células del sistema inmunitario son células T  $\gamma\delta$ . En determinadas realizaciones, las células del sistema inmunitario son una combinación de células NK y células T  $\gamma\delta$ . En determinadas realizaciones, las células del sistema inmunitario son una combinación de células NK y células T  $\gamma\delta$ , en las que, como mínimo, una parte de las células NK y/o las células T  $\gamma\delta$  expresan un receptor para un antígeno inducido por estrés. En determinadas realizaciones, las células del sistema inmunitario son una combinación de células NK y células T  $\gamma\delta$ , en las que, como mínimo, una parte de las células NK y/o las células T  $\gamma\delta$  expresan un receptor NKG2D.

60 En determinadas realizaciones, la composición celular comprende una célula T  $\gamma\delta$  y una célula adicional del sistema inmunitario. Por ejemplo, la composición celular puede comprender células T  $\gamma\delta$  y células NK o puede comprender células T  $\gamma\delta$ , células T  $\alpha\beta$  y células NK. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T

$\gamma\delta$  y una célula adicional del sistema inmunitario, en la que las células T  $\gamma\delta$  están presentes en una cantidad superior o igual al 60 % de la población celular total. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  y células NK, en la que las células T  $\gamma\delta$  están presentes en una cantidad superior o igual al 60 % de la población celular total. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  y células NK, en la que las células T  $\gamma\delta$  están presentes en una cantidad superior o igual al 60 % de la población celular total y las células NK están presentes en una cantidad inferior o igual al 25 %. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  y células T  $\alpha\beta$ , en la que las células T  $\gamma\delta$  están presentes en una cantidad superior o igual al 60 % de la población celular total. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  y células T  $\alpha\beta$ , en la que las células T  $\gamma\delta$  están presentes en una cantidad superior o igual al 60 % de la población celular total y las células T  $\alpha\beta$  están presentes en una cantidad inferior o igual al 5 %. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$ , células T  $\alpha\beta$  y células NK, en la que las células T  $\gamma\delta$  están presentes en una cantidad superior o igual al 60 % de la población celular total. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$ , células T  $\alpha\beta$  y células NK, en la que las células T  $\gamma\delta$  están presentes en una cantidad superior o igual al 60 % de la población celular total, las células T  $\alpha\beta$  están presentes en una cantidad inferior o igual al 5 % y las células NK están presentes en una cantidad inferior o igual al 25 %. El porcentaje de diversos tipos de células presentes, en una realización, se determina mediante citometría de flujo, tal como se describe en el ejemplo 3.

Como mínimo, una parte de las células T  $\gamma\delta$  expresan un receptor para un antígeno inducido por estrés o un receptor NKG2D. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$ , células T  $\alpha\beta$  y células NK y, como mínimo, una parte de las células T  $\gamma\delta$  expresan un receptor para un antígeno inducido por estrés o un receptor NKG2D. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$ , células T  $\alpha\beta$  y células NK y, como mínimo, una parte de las células T  $\gamma\delta$  expresan un receptor para un antígeno inducido por estrés o un receptor NKG2D, en la que las células T  $\gamma\delta$  están presentes en una cantidad superior o igual al 60 % de la población celular total. En determinadas realizaciones, la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$ , células T  $\alpha\beta$  y células NK y, como mínimo, una parte de las células T  $\gamma\delta$  expresan un receptor para un antígeno inducido por estrés o un receptor NKG2D, en la que las células T  $\gamma\delta$  están presentes en una cantidad superior o igual al 60 % de la población celular total, las células T  $\alpha\beta$  están presentes en una cantidad inferior o igual al 5 % y las células NK están presentes en una cantidad inferior o igual al 25 %. En determinadas realizaciones, el receptor para un antígeno inducido por estrés o el receptor NKG2D están presentes de forma natural, como mínimo, en una parte de las células T  $\gamma\delta$ , las células T  $\alpha\beta$  y/o las células NK. En determinadas realizaciones, el receptor para un antígeno inducido por estrés o el receptor NKG2D se inducen hasta un nivel aumentado, como mínimo, en una parte de las células T  $\gamma\delta$ , las células T  $\alpha\beta$  y/o las células NK. En determinadas realizaciones, como mínimo, una parte de las células T  $\gamma\delta$ , las células T  $\alpha\beta$  y/o las células NK están modificadas para expresar el receptor para un antígeno inducido por estrés o el receptor NKG2D. El porcentaje de diversos tipos de células presentes, en una realización, se determina mediante citometría de flujo, tal como se describe en el ejemplo 3.

En un aspecto de lo anterior, el antígeno tumoral es cualquier antígeno tumoral conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, el antígeno tumoral se selecciona de manera que esté presente, como mínimo, una de las siguientes características: el antígeno se expresa en tantos estadios del cáncer como sea posible, el antígeno se expresa en la superficie del tumor, el antígeno es importante para la viabilidad de la célula tumoral y el antígeno no se expresa en un tejido no tumoral o se expresa a un nivel tal que los efectos fuera de la diana son clínicamente aceptables. En determinadas realizaciones, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en EphA2, antígeno de maduración de células B (BCMA, *B cell maturation antigen*), B7-H3, B7-H6, CAIX, CA9, CD22, CD19, CD20, ROR1, cadena kappa o ligera, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, CA-125, glipicano-3, antígeno tumoral epitelial, antígeno asociado a melanoma, EGP2, EGP40, EPCAM, ERBB3, ERBB4, ErbB3/4, PAP, FAR, FBP, AchR fetal, receptor  $\alpha$  de folato, p53 mutado, ras mutado, HER2, ERBB2, HER3, proteína de unión a folato, glicoproteína gp120 de la envoltura de VIH-1, glicoproteína gp41 de la envoltura de VIH-1, 5T4, 8H9, GD2, CD123, CD23, CD33, CD30, CD38, CD56, c-Met, fap, mesotelina, GD3, HERV-K, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ , CSPG4, Lewis-Y, MCSP, Muc1, Muc16, NCAM, ligandos de NKG2D, NY-ES0-1, PRAME, PSCA, PSCI, PSMA, EGFR, Sp17, SURVIVINA, TAG72, TEM1, TEM8, EGFRvIII y VEGFR2.

En un aspecto de lo anterior, el TAA específico de glioma es cualquier TAA específico de glioma conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, el TAA específico de glioma se selecciona de manera que esté presente, como mínimo, una de las siguientes características: el TAA específico de glioma se expresa en tantos estadios del cáncer como sea posible, el TAA específico de glioma se expresa en la superficie del tumor, el TAA específico de glioma es importante para la viabilidad de la célula tumoral y el TAA específico de glioma no se expresa en un tejido no tumoral o se expresa a un nivel tal que los efectos fuera de la diana son clínicamente aceptables. En determinadas realizaciones, el TAA específico de glioma se selecciona del grupo que consiste en ligandos de NKG2D, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A, MIC-B, EGFRvIII e IL13R $\alpha$ . En determinadas realizaciones, el TAA específico de glioma es EGFRvIII. En determinadas realizaciones, el TAA específico de glioma es IL13R $\alpha$ .

En un aspecto de lo anterior, el TAA específico de neuroblastoma es cualquier TAA específico de glioma conocido

- en la técnica. En determinadas realizaciones, el TAA específico de neuroblastoma se selecciona de manera que esté presente, como mínimo, una de las siguientes características: el TAA específico de neuroblastoma se expresa en tantos estadios del cáncer como sea posible, el TAA específico de neuroblastoma se expresa en la superficie del tumor, el TAA específico de neuroblastoma es importante para la viabilidad de la célula tumoral y el TAA específico de neuroblastoma no se expresa en un tejido no tumoral o se expresa a un nivel tal que los efectos fuera de la diana son clínicamente aceptables. En determinadas realizaciones, el TAA específico de neuroblastoma se selecciona del grupo que consiste en ligandos de NKG2D, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A, MIC-B y GD2. En determinadas realizaciones, el TAA específico de neuroblastoma es GD2.
- El factor de supervivencia puede ser cualquier factor conocido en la técnica que proporcione resistencia a un tratamiento terapéutico adicional y/o permita que las células que comprenden las composiciones celulares sobrevivan en un entorno de tratamiento (tal como un entorno de tratamiento de quimioterapia). En determinadas realizaciones, el tratamiento terapéutico adicional es un tratamiento con un agente contra el cáncer, un antagonista metabólico, un agente desmetilante del ADN, un agente antitumoral derivado de plantas, un fármaco para quimioterapia de análogos de nucleósidos/nucleótidos, un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico contra el cáncer, un inhibidor de la topoisomerasa, un inhibidor mitótico, un agente diferenciador, un agente de terapia hormonal y combinaciones de los anteriores, y el factor de supervivencia proporciona resistencia al tratamiento terapéutico adicional. Se puede utilizar una variedad de agentes específicos en los tratamientos terapéuticos adicionales, tal como se conoce en la técnica y, tal como se describe en el presente documento. Entre los agentes alquilantes representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalán. Entre los antagonistas metabólicos representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, metotrexato (MTX), 5-fluorouracilo o derivados de los mismos. Entre los agentes desmetilantes del ADN representativos (también conocidos como antimetabolitos) se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, azacitidina. Entre los fármacos de quimioterapia de análogos de nucleósidos/nucleótidos representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, un nucleótido sustituido y un nucleósido sustituido. Entre los antibióticos antitumorales representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, mitomicina, adriamicina y doxorubicina. Entre los agentes antitumorales derivados de plantas representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, vincristina, vindesina, TAXOL<sup>®</sup>, paclitaxel, abraxane, cisplatino, carboplatino, etopósido y similares. Entre los agentes contra el cáncer representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, trimetotrexato (TMTX), temozolomida (TMZ), raltitrexed, S-(4-nitrobencil)-6-tioinosina (NMBPR), 6-benciguanidina (6-BG), nitrosoureas [por ejemplo, bis-cloronitrosourea (BCNU; carmustina), lomustina (CCNU) +/- procarbazona y vincristina (régimen PCV), doxorubicina, fotemustina, citarabina, camptotecina y un derivado terapéutico de cualquiera de los anteriores. De manera preferente, entre los agentes utilizados en el tratamiento terapéutico adicional se incluyen TMZ, doxorubicina, melfalán, nitrosoureas y cualquier combinación de los mismos.
- En determinadas realizaciones, el factor de supervivencia es MGMT, la proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR1) o 5' nucleotidasa II (NT5C2). Entre otros factores de supervivencia se incluyen, por ejemplo, una variante resistente a fármacos de la dihidrofolato reductasa (L22Y-DHFR) y la timidilato sintasa. De manera preferente, el factor de supervivencia es MGMT. Sin embargo, se pueden utilizar otros factores de supervivencia dependiendo de la naturaleza del entorno de tratamiento (es decir, qué otros tratamientos terapéuticos adicionales se le están dando al paciente en combinación con las composiciones celulares de la presente divulgación).
- En un aspecto de lo anterior, las células de la composición comprenden, además, un gen suicida.
- En un aspecto de lo anterior, la composición celular comprende más o igual al 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % de un único tipo de célula del sistema inmunitario. En un aspecto de lo anterior, la composición celular comprende más o igual al 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % de células T  $\gamma\delta$ . En un aspecto de lo anterior, la composición celular comprende más o igual al 60 % de células T  $\gamma\delta$  y menos o igual al 5 % de células T  $\alpha\beta$  y menos o igual al 25 % de células NK. El porcentaje de varios tipos de células presentes, en una realización, se determina mediante citometría de flujo, tal como se describe en el ejemplo 3.
- En otro aspecto de lo anterior, las células T  $\gamma\delta$  se obtienen de un paciente y se expanden/activan ex vivo; a continuación, las células se pueden volver a introducir en el paciente.
- Las composiciones celulares descritas pueden denominarse células T DRI-CAR.
- Las composiciones celulares descritas en el presente documento se pueden producir mediante la incorporación de una construcción de ácido nucleico que codifica y es capaz de expresar un CAR y un factor de supervivencia, así como otros elementos (por ejemplo, un gen suicida y/o un receptor para un antígeno inducido por estrés). En determinadas realizaciones, una única construcción de ácido nucleico codifica el CAR y el factor de supervivencia, así como otros elementos (por ejemplo, un gen suicida y/o un receptor para un antígeno inducido por estrés). En determinadas realizaciones, las construcciones de ácido nucleico separadas codifican el CAR y el factor de supervivencia, así como otros elementos (por ejemplo, un gen suicida y/o un receptor para un antígeno inducido por estrés). Los procedimientos para producir dichas construcciones de ácido nucleico son conocidos en la técnica. En las figuras 1A-1D se muestran construcciones de ácido nucleico representativas que codifican el CAR y/o el factor de supervivencia.

En determinadas realizaciones, la construcción de ácido nucleico codifica un CAR y un factor de supervivencia. En las realizaciones anteriores, el CAR puede comprender los dominios y/o secuencias descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, la construcción de ácido nucleico codifica un CAR que comprende un ectodominio que comprende un scFv dirigido al antígeno EGFRvIII, una región bisagra, una región transmembrana y un endodominio que comprende, como mínimo, un dominio de señalización. En determinadas realizaciones, la construcción de ácido nucleico codifica un CAR que comprende un ectodominio que comprende un scFv dirigido al antígeno IL13R $\alpha$ , una región bisagra, una región transmembrana y un endodominio que comprende, como mínimo, un dominio de señalización. En determinadas realizaciones, la construcción de ácido nucleico codifica un CAR que comprende un ectodominio que comprende un scFv dirigido al antígeno EGFRvIII, una región bisagra de IgG, una región transmembrana de CD3-zeta y un endodominio que comprende los dominios de señalización de CD28, Ox40 y CD32. En determinadas realizaciones, la construcción de ácido nucleico codifica un CAR que comprende un ectodominio que comprende un scFv dirigido al antígeno IL13R $\alpha$ , una región bisagra de IgG, una región transmembrana de CD3-zeta y un endodominio que comprende los dominios de señalización de CD28, Ox40 y CD32.

La construcción de ácido nucleico puede incorporarse en un vector de expresión antes de la introducción en la célula huésped. Dichos procedimientos son conocidos en la técnica. Tal como se describió anteriormente, se puede utilizar un único vector de expresión o se pueden utilizar múltiples vectores de expresión dependiendo de la naturaleza de la construcción de ácido nucleico. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. En determinadas realizaciones, el vector de expresión es un plásmido. En determinadas realizaciones, el vector de expresión es un vector viral. En determinadas realizaciones, el vector de expresión es un vector retroviral. En determinadas realizaciones, el vector de expresión es un vector lentiviral. El vector de expresión puede ser capaz de replicarse dentro de la célula del sistema inmunitario (también denominada célula huésped) o el vector de expresión puede integrarse, total o parcialmente, en el genoma de la célula del sistema inmunitario, permitiendo así la replicación de la construcción de ácido nucleico junto con el genoma de la célula huésped.

Los vectores de expresión comprenden una construcción de ácido nucleico en una forma adecuada para la expresión de la construcción de ácido nucleico en una célula huésped. Por tanto, los vectores de expresión contienen los elementos necesarios para la expresión de la construcción de ácido nucleico en la célula huésped. Los elementos necesarios variarán dependiendo de la naturaleza de la célula huésped y del vector, así como de otros factores (tales como el nivel de expresión deseado). Por ejemplo, un vector puede contener una o más secuencias reguladoras (tales como secuencias promotoras, secuencias potenciadoras y otras secuencias similares) unidas de manera operativa a la construcción de ácido nucleico permitiendo así la expresión de la construcción de ácido nucleico. Las secuencias reguladoras pueden ser específicas de una célula, de manera que la construcción de ácido nucleico se exprese solo en un tipo de célula específica, o las secuencias reguladoras pueden ser constitutivas, de manera que la construcción de ácido nucleico se exprese en cualquier tipo de células.

#### Receptores de antígenos quiméricos

Las células que comprenden las composiciones celulares de la presente divulgación incorporan uno o más CAR. Aunque se proporciona ejemplos específicos de CAR para su utilización en el tratamiento de GBM, también se pueden utilizar otros CAR diseñados para el tratamiento de cánceres adicionales. La presente divulgación puede utilizar cualquier CAR conocido en la técnica. Los procedimientos para producir CAR con una especificidad deseada para un antígeno asociado a un tumor son conocidos en la técnica. El CAR permite que las células del sistema inmunitario de la presente divulgación reconozcan los antígenos tumorales de una manera que no está restringida por el MHC. Además, puede diseñarse un CAR para reconocer un antígeno que no se deriva de una proteína.

Los CAR tienen, en general, la siguiente estructura: un ectodominio que comprende un dominio de reconocimiento de antígeno, un dominio transmembrana y un endodominio. En determinadas realizaciones, en el CAR puede estar presente un enlazador peptídico de 1 a 15 aminoácidos para separar los diversos dominios del CAR. Por ejemplo, un enlazador peptídico puede estar presente entre el dominio de reconocimiento de antígeno y el dominio transmembrana o el dominio transmembrana y el endodominio. Un enlazador peptídico puede estar presente entre todos los dominios o solo entre una parte de los dominios. Además, cuando el endodominio comprende más de un elemento, un enlazador peptídico puede estar presente entre algunos o todos los elementos individuales del endodominio.

Los CAR se pueden producir inicialmente incorporando una secuencia de señal (que, en general, se elimina posteriormente durante el procesamiento del CAR). El péptido señal dirige la proteína naciente una vez expresada hacia el retículo endoplásmico, lo que permite modificar el CAR (por ejemplo, glicosilarlo) y su inserción en la membrana celular. Se puede utilizar cualquier secuencia de péptido señal eucariota. En general, se utiliza el péptido señal unido de forma nativa al componente más amino terminal (por ejemplo, en un scFv con orientación cadena ligera - enlazador - cadena pesada, se utiliza la señal nativa de la cadena ligera).

El dominio de reconocimiento de antígeno puede ser cualquier dominio que reconozca un antígeno tumoral. En realizaciones específicas, el dominio de reconocimiento de antígeno se dirige a un TAA específico de glioma. En

realizaciones específicas, el dominio de reconocimiento de antígeno se dirige a un antígeno tumoral. En realizaciones específicas, el dominio de reconocimiento de antígeno se dirige a un TAA específico de neuroblastoma. Los antígenos específicos para el reconocimiento por el dominio de reconocimiento de antígeno se dan a conocer anteriormente. Hay muchas alternativas para el dominio de reconocimiento de antígeno. Se ha descrito un dominio de reconocimiento de antígeno de las cadenas simples alfa y beta del receptor de células T (TCR, *T-cell receptor*) nativas, ya que tienen ectodominios simples (por ejemplo, un ectodominio CD4 para reconocer células infectadas por VIH) y ectodominios más exóticos que comprenden componentes de reconocimiento, tales como una citocina unida (que conduce al reconocimiento de células que portan el receptor de citocina). De hecho, como región de reconocimiento de antígeno se puede utilizar cualquier resto que se una a una diana determinada con afinidad elevada. En una realización preferente, la región de reconocimiento de antígeno es un scFV. En determinadas realizaciones, un péptido enlazador (es decir, una región espaciadora o región bisagra) une el dominio de unión a antígeno al dominio transmembrana.

En determinadas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno es un scFV. Un scFV se refiere a una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ) de una inmunoglobulina, conectada con un péptido enlazador corto (en general, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 aminoácidos) para producir una estructura  $V_H$ -enlazador- $V_L$  (también denominada dominio de unión a antígeno). El enlazador suele ser rico en glicina para la flexibilidad, así como en serina o treonina para la solubilidad, y puede conectar el extremo N terminal de la  $V_H$  con el extremo C terminal de la  $V_L$ , o viceversa. Este scFV conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y de la introducción del enlazador.

En determinadas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno es un scFV multivalente. Un scFV multivalente comprende dos dominios de unión a antígeno derivados de inmunoglobulina (tal como una cadena  $V_H$ -enlazador- $V_L$ ) unidos por un enlazador adicional, en el que el dominio de unión a antígeno reconoce diferentes antígenos o diferentes partes del mismo antígeno. En determinados aspectos, uno de los dominios de unión a antígeno reconoce una molécula de activación en la célula diana. En determinados aspectos, uno de los dominios de unión a antígeno reconoce un antígeno, cuya expresión aumenta en la célula diana como resultado del tratamiento terapéutico adicional (tal como, pero sin limitarse al mismo, un antígeno inducido por estrés).

En determinadas realizaciones, el dominio de reconocimiento de antígeno es un scFV bivalente. Dicho scFV bivalente puede tener la estructura  $V_{H1}$ -enlazador<sub>a</sub>- $V_{L1}$ - $V_{H2}$ -enlazador<sub>b</sub>- $V_{L2}$ -enlazador<sub>c</sub>- $V_{H3}$ -enlazador<sub>d</sub>- $V_{L3}$  como ejemplo (entendiéndose que  $V_H$  y  $V_L$  pueden estar dispuestos en diferentes orientaciones, tal como se ha descrito anteriormente).

El péptido enlazador debe ser lo suficientemente flexible para permitir que el dominio de unión a antígeno adopte conformaciones adecuadas para el reconocimiento y la unión del antígeno. La forma más simple es la región bisagra de IgG1. Se puede utilizar una variedad de péptidos enlazadores junto con los CAR descritos en el presente documento.

El dominio transmembrana es una región hidrófoba (tal como una hélice alfa) que abarca la membrana de la célula en la que se incorpora el CAR. Se puede utilizar un dominio transmembrana de cualquier proteína incrustada en la membrana. En general, se utiliza el dominio transmembrana del componente más próximo a la membrana del endodominio, tal como, por ejemplo, para facilitar la transmisión de una señal desde el dominio de reconocimiento de antígeno al endodominio. De modo interesante, la utilización del dominio transmembrana de CD3-zeta puede dar lugar a la incorporación del TCR artificial en el TCR nativo, un factor que depende de la presencia del residuo de ácido aspártico cargado en la transmembrana de CD3-zeta nativo.

El endodominio permite la transmisión de una señal después de la unión al antígeno. Después del reconocimiento del antígeno, los receptores se agrupan y se transmite una señal a la célula del sistema inmunitario que contiene el CAR. El endodominio comprende, como mínimo, un dominio de señalización. En determinadas realizaciones, el endodominio comprende más de 1 dominio de señalización. El dominio de señalización más utilizado habitualmente es CD3-zeta, que contiene tres motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM). Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el dominio de señalización comprende, como mínimo, un ITAM. En determinadas realizaciones, el endodominio comprende CD3-zeta. En determinadas realizaciones, el endodominio comprende CD3-zeta y, como mínimo, un dominio de señalización adicional. El endodominio transmite una señal de activación a la célula después de unirse al antígeno. Los CAR de "primera generación" tienen habitualmente el endodominio de CD3-zeta, que es el principal transmisor de señales de los TCR endógenos. Los CAR de "segunda generación" añaden dominios de señalización intracelular de diversos receptores de proteínas coestimuladoras (por ejemplo, CD28, 41BB, DAP10, OX40 o ICOS) a la cola citoplásmica del endodominio para proporcionar señales adicionales a la célula T. Más recientemente, los CAR de "tercera generación" tienen un endodominio que combina múltiples dominios de señalización, tales como CD3-zeta-CD28-41BB o CD3-zeta-CD28-OX40, para aumentar adicionalmente la potencia. En determinadas realizaciones, el endodominio comprende CD3-zeta-CD28-OX40.



En otra realización, la presente divulgación da a conocer un procedimiento para tratar a un sujeto que padece glioma utilizando un tratamiento de inmunoterapia y un tratamiento terapéutico adicional que utiliza, por ejemplo, quimioterapia con TMZ, comprendiendo el procedimiento: (i) administrar al sujeto una composición celular que comprende células T  $\gamma\delta$  que expresan un CAR dirigido al TAA específico de glioma EGFRvIII (comprendiendo el endodominio del CAR, como mínimo, un dominio de señalización), un receptor NKGD2 y  $O^6$ -metilguanina-ADN metiltransferasa que proporciona resistencia, por ejemplo, a la quimioterapia con TMZ, que permite que las células T  $\gamma\delta$  que expresan el CAR sobrevivan en un entorno de tratamiento resultante del tratamiento terapéutico adicional; y (ii) administrar al sujeto el tratamiento terapéutico adicional, en el que el tratamiento terapéutico adicional se administra antes de la administración de la composición celular al sujeto, después de la administración de la composición celular al sujeto, de manera simultánea con la administración de la composición celular al sujeto o cualquier combinación de las anteriores.

En otra realización, la presente divulgación da a conocer un procedimiento para tratar a un sujeto que padece cáncer utilizando un tratamiento de inmunoterapia y un tratamiento terapéutico adicional que utiliza, por ejemplo, quimioterapia con TMZ, comprendiendo el procedimiento: (i) administrar al sujeto una composición celular que comprende células T  $\gamma\delta$  que expresan un CAR dirigido al TAA específico de glioma IL13R $\alpha$  (comprendiendo el endodominio del CAR, como mínimo, un dominio de señalización), un receptor NKGD2 y  $O^6$ -metilguanina-ADN metiltransferasa que proporciona resistencia, por ejemplo, a la quimioterapia con TMZ, que permite que las células T  $\gamma\delta$  que expresan el CAR sobrevivan en un entorno de tratamiento resultante del tratamiento terapéutico adicional; y (ii) administrar al sujeto el tratamiento terapéutico adicional, en el que el tratamiento terapéutico adicional se administra antes de la administración de la composición celular al sujeto, después de la administración de la composición celular al sujeto, de manera simultánea con la administración de la composición celular al sujeto o cualquier combinación de las anteriores.

En otra realización, la presente divulgación da a conocer un procedimiento para tratar a un sujeto que padece neuroblastoma utilizando un tratamiento de inmunoterapia y un tratamiento terapéutico adicional que utiliza, por ejemplo, quimioterapia con TMZ, comprendiendo el procedimiento: (i) administrar al sujeto una composición celular que comprende células T  $\gamma\delta$  que expresan un CAR dirigido al TAA específico de neuroblastoma GD2 (comprendiendo el endodominio del CAR, como mínimo, un dominio de señalización), un receptor NKGD2 y  $O^6$ -metilguanina-ADN metiltransferasa que proporciona resistencia, por ejemplo, a la quimioterapia con TMZ, que permite que las células T  $\gamma\delta$  que expresan el CAR sobrevivan en un entorno de tratamiento resultante del tratamiento terapéutico adicional; y (ii) administrar al sujeto el tratamiento terapéutico adicional, en el que el tratamiento terapéutico adicional se administra antes de la administración de la composición celular al sujeto, después de la administración de la composición celular al sujeto, de manera simultánea con la administración de la composición celular al sujeto o cualquier combinación de las anteriores.

En determinadas realizaciones de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular es cualquier composición celular descrita en el presente documento. En determinadas realizaciones de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se puede administrar al sujeto más de una vez, administrándose el tratamiento terapéutico adicional antes, después o tanto antes como después de cada administración de la composición celular. En determinadas realizaciones de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se puede administrar al sujeto más de una vez, administrándose el tratamiento terapéutico adicional antes, después o tanto antes como después de la primera administración de la composición celular y, de manera opcional, antes, después o tanto antes como después de cada administración adicional de la composición celular. En determinadas realizaciones de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se puede administrar al sujeto una vez por semana durante 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas o más.

En determinadas realizaciones de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tratamiento terapéutico adicional se administra al sujeto de 24 a 48 horas antes, después, o antes y después de la administración de la composición celular. En determinadas realizaciones de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se administra al sujeto el día X y el tratamiento terapéutico adicional se administra al sujeto de 12 a 72 horas antes del día X, de 12 a 72 horas después del día X o de 12 a 72 horas antes y después del día X. En determinadas realizaciones de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se administra al sujeto el día X y el tratamiento terapéutico adicional se administra al sujeto de 12 a 72 horas antes del día X, de 12 a 72 horas después del día X o de 12 a 72 horas antes y después del día X, seguido de una administración adicional de la composición celular al sujeto en el día Y, con administración opcional del tratamiento terapéutico adicional al sujeto de 12 a 72 horas antes del día Y, de 12 a 72 horas después del día Y o de 12 a 72 horas antes y después del día Y.

En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el CAR de la composición celular es específico para el cáncer a tratar. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el factor de supervivencia de la composición celular confiere resistencia al tratamiento terapéutico/tratamiento terapéutico adicional.

Las composiciones celulares de la presente divulgación se pueden administrar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se

administra por vía intravenosa. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se administra por vía intracranial. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se administra por vía intraarterial. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se administra directamente en el lecho tumoral. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se administra cerca o adyacente al tumor. En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, la composición celular se administra mediante una combinación de los anteriores.

En un aspecto de cualquiera de los procedimientos anteriores, el tratamiento terapéutico adicional (por ejemplo, quimioterapia con TMZ) proporciona, como mínimo, una de las siguientes ventajas: mayor eficacia de la composición celular a través de la inducción de antígenos inducidos por estrés, mayor reconstitución homeostática de la composición celular, aumento de la proliferación *in vivo* y aumento de la persistencia de la composición celular (lo anterior en comparación con un tratamiento similar cuando se omite el tratamiento terapéutico adicional).

En determinadas realizaciones, el cáncer es sensible al tratamiento terapéutico adicional para el cual las células se han modificado para ser resistentes. Dicho tratamiento terapéutico adicional al que las células cancerosas pueden ser sensibles incluye, pero sin limitarse a los mismos: agentes contra el cáncer, antagonistas metabólicos, agentes desmetilantes del ADN, agentes antitumorales derivados de plantas, fármacos para quimioterapia de análogos de nucleósidos/nucleótidos, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos contra el cáncer, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores mitóticos, agentes diferenciadores, agentes de terapia hormonal y combinaciones de los anteriores. Se puede utilizar una variedad de agentes específicos en los tratamientos terapéuticos adicionales, tal como se conoce en la técnica y, tal como se describe en el presente documento. Entre los agentes alquilantes representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalán. Entre los antagonistas metabólicos representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, metotrexato (MTX), 5-fluorouracilo o derivados de los mismos. Entre los agentes desmetilantes del ADN representativos (también conocidos como antimetabolitos) se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, azacitidina. Entre los fármacos de quimioterapia de análogos de nucleósidos/nucleótidos representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, un nucleótido sustituido y un nucleósido sustituido. Entre los antibióticos antitumorales representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, mitomicina, adriamicina y doxorubicina. Entre los agentes antitumorales derivados de plantas representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, vincristina, vindesina, TAXOL<sup>®</sup>, paclitaxel, abraxane, cisplatino, carboplatino, etopósido y similares. Entre los agentes contra el cáncer representativos se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, trimetotrexato (TMTX), temozolomida (TMZ), raltitrexed, S-(4-nitrobenzil)-6-tioinosina (NMBPR), 6-benciguanidina (6-BG), nitrosoureas [por ejemplo, bis-cloronitrosourea (BCNU; carmustina), lomustina (CCNU) +/- procarbazona y vincristina (régimen PCV), doxorubicina, fotemustina, citarabina, camptotecina y un derivado terapéutico de cualquiera de los anteriores. De manera preferente, entre los agentes utilizados en el tratamiento terapéutico adicional al que las células cancerosas pueden ser sensibles se incluyen TMZ, doxorubicina, melfalán, nitrosoureas y cualquier combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, el cáncer es resistente al tratamiento terapéutico adicional para el cual las células se han modificado para ser resistentes. En dichas realizaciones, el tratamiento terapéutico adicional proporciona, como mínimo, una de las ventajas descritas anteriormente. En una realización, el tratamiento terapéutico adicional aumenta la expresión de un antígeno inducido por estrés, que son ligandos para el receptor NKG2D. Entre los antígenos inducidos por estrés específicos que están regulados por incremento se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A y MIC-B.

En determinadas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer epitelial, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cánceres de las vías genitourinarias, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de riñón, cáncer gástrico, cáncer de intestino delgado, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cánceres de las vías biliares, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de tiroides y neoplasias malignas hematológicas, leucemia, linfoma, mieloma múltiple y síndromes mielodisplásicos.

En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de cerebro. En determinadas realizaciones, el cáncer es tumores pineales, tumores hipofisarios, PNET, schwannoma, linfoma, meduloblastoma, meningioma, cáncer cerebral metastásico, neurofibroma, tumores neuronales y mixtos neuronales-gliales, oligoastrocitoma, oligodendroglioma, astrocitoma, tumor rabdoide teratoide atípico (TRTA), condrosarcoma, tumores del plexo coroideo, craneofaringioma, ependimoma, tumor de células germinales, neuroblastoma, glioblastoma (GBM) y glioma. En determinadas realizaciones, el cáncer es glioblastoma. En determinadas realizaciones, el cáncer es neuroblastoma.

En determinadas realizaciones, el antígeno tumoral es cualquier antígeno tumoral conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, el antígeno tumoral se selecciona de manera que esté presente, como mínimo, una de las siguientes características: el antígeno se expresa en tantos estadios del cáncer como sea posible, el antígeno se expresa en la superficie del tumor, el antígeno es importante para la viabilidad de la célula tumoral y el antígeno no se expresa en un tejido no tumoral o se expresa a un nivel tal que los efectos fuera de la diana son clínicamente aceptables. En determinadas realizaciones, el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en EphA2, antígeno de maduración de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, CAIX, CA9, CD22, CD19, CD20, ROR1, cadena

5 kappa o ligera, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, CA-125, glipicano-3, antígeno tumoral epitelial, antígeno asociado a melanoma, EGP2, EGP40, EPCAM, ERBB3, ERBB4, ErbB3/4, PAP, FAR, FBP, AchR fetal, receptor  $\alpha$  de folato, p53 mutado, ras mutado, HER2, ERBB2, HER3, proteína de unión a folato, glicoproteína gp120 de la envoltura de VIH-1, glicoproteína gp41 de la envoltura de VIH-1, 5T4, 8H9, GD2, CD123, CD23, CD33, CD30, CD38, CD56, c-Met, fap, mesotelina, GD3, HERV-K, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ , CSPG4, Lewis-Y, MCSP, Muc1, Muc16, NCAM, ligandos de NKG2D, NY-ES0-1, PRAME, PSCA, PSCI, PSMA, EGFR, Sp17, SURVIVINA, TAG72, TEM1, TEM8, EGFRvIII y VEGFR2.

10 En determinadas realizaciones, el TAA específico de glioma es cualquier TAA específico de glioma conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, el TAA específico de glioma se selecciona de manera que esté presente, como mínimo, una de las siguientes características: el TAA específico de glioma se expresa en tantos estadios del cáncer como sea posible, el TAA específico de glioma se expresa en la superficie del tumor, el TAA específico de glioma es importante para la viabilidad de la célula tumoral y el TAA específico de glioma no se expresa en un tejido no tumoral o se expresa a un nivel tal que los efectos fuera de la diana son clínicamente aceptables. En determinadas realizaciones, el TAA específico de glioma se selecciona del grupo que consiste en ligandos de NKG2D, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A, MIC-B, EGFRvIII e IL13R $\alpha$ . En determinadas realizaciones, el TAA específico de glioma es EGFRvIII. En determinadas realizaciones, el TAA específico de glioma es IL13R $\alpha$ .

20 En determinadas realizaciones, el TAA específico de neuroblastoma es cualquier TAA específico de glioma conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, el TAA específico de neuroblastoma se selecciona de manera que esté presente, como mínimo, una de las siguientes características: el TAA específico de neuroblastoma se expresa en tantos estadios del cáncer como sea posible, el TAA específico de neuroblastoma se expresa en la superficie del tumor, el TAA específico de neuroblastoma es importante para la viabilidad de la célula tumoral y el TAA específico de neuroblastoma no se expresa en un tejido no tumoral o se expresa a un nivel tal que los efectos fuera de la diana son clínicamente aceptables. En determinadas realizaciones, el TAA específico de neuroblastoma se selecciona del grupo que consiste en ligandos de NKG2D, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A, MIC-B y GD2. En determinadas realizaciones, el TAA específico de neuroblastoma es GD2.

30 La modificación genética DRI, por ejemplo, la utilización del gen de MGMT, permite que las composiciones celulares de la presente divulgación funcionen en un entorno rico en quimioterapia en un momento en el que es probable que el tumor esté sometido a estrés máximo. El efecto del estrés sobre el tumor, en determinadas realizaciones, aumenta la expresión de antígenos con estrés, que son reconocidos por receptores, tales como el receptor NKG2D, en células T  $\gamma\delta$ . El doble efecto de inducir antígenos con estrés y disminuir las células T reguladoras con quimioterapia mejora de manera significativa la reducción de tumores sobre cualquiera de los regímenes individuales. La modificación genética protege las composiciones celulares de la presente divulgación de los efectos de agotamiento de linfocitos de un régimen de quimioterapia, por ejemplo, con TMZ, y permite que las composiciones celulares de la presente divulgación accedan de manera específica al tumor a través de TAA combinado con una función citotóxica de células T intacta en el momento en que las células malignas están sometidas a un estrés máximo por la quimioterapia. Se cree que la utilización de las composiciones celulares de la presente divulgación (denominada terapia de células T DRI-CAR) prolonga de manera significativa la supervivencia y reduce la carga tumoral en comparación con el tratamiento con quimioterapia (por ejemplo, con TMZ) solo o la infusión de células T  $\gamma\delta$  sola y lo hace sin consecuencias sistémicas o neurológicas adversas significativas.

45 La justificación de las composiciones celulares y los procedimientos de la presente divulgación se basa en trabajos previos que muestran (a) que las células de GBM humanas son muy vulnerables al ataque por células T  $\gamma\delta$  expandidas/activadas *ex vivo* (1, 2) (b) la inyección intracraneal local de células T  $\gamma\delta$  expandidas/activadas prolonga la supervivencia de los ratones portadores de tumores mediante ralentización y ralentiza la progresión de los xenoinjertos de GBM (3) y de los tumores derivados de GL261 en un modelo en ratón inmunocompetente C56BL/6; (c) los clones resistentes a TMZ de las líneas celulares humanas de GBM SNB-19 y U373 son destruidos con una eficacia significativamente mayor por las células T  $\gamma\delta$  modificadas por MGMT en presencia de TMZ que por TMZ o células T  $\gamma\delta$  (4) y, de la manera más importante, (d) los ratones portadores de clones no modificados o resistentes a TMZ de xenoinjertos de GBM humanos primarios muestran una supervivencia mejorada cuando se tratan con inyecciones intracraneales de células T  $\gamma\delta$  modificadas genéticamente en comparación con cualquiera de los tratamientos solos. Por lo tanto, se espera que las composiciones celulares de la presente divulgación que comprenden células T  $\gamma\delta$  modificadas para resistir a un tratamiento terapéutico adicional (por ejemplo, con TMZ), prolonguen de manera significativa la supervivencia y reduzcan la carga tumoral en comparación con cualquier tratamiento por separado y lo harán sin provocar consecuencias sistémicas o neurológicas adversas significativas.

60 Varios estudios recientes han demostrado que la sincronización de la quimioterapia y la inmunoterapia para neoplasias extracraneales sólidas aprovecha la respuesta innata a la expresión inducida por quimioterapia de antígenos asociados al estrés en células tumorales (8-10) y el agotamiento de células T reguladoras. El doble efecto de inducir antígenos por estrés y disminuir las células T reguladoras puede dar lugar a una reducción tumoral significativamente mejorada en comparación con cualquiera de los regímenes individuales (11-17). La implementación exitosa de esta estrategia para los cánceres, que incluyen, pero sin limitarse a los mismos, GBM,

65

sería un punto de partida significativo a partir de los enfoques clásicos que se han basado en el reconocimiento adaptativo de antígenos asociados a tumores (18, 19), la expresión de MHC de Clase I de células de glioma (20, 21) o la terapia con células asesinas activadas por linfocinas (LAK, *lymphokine-activated killer*) (22-26).

5 Los solicitantes han desarrollado previamente un sistema robusto para la fabricación de células T  $\gamma\delta$  expandidas/activadas que se dirigen definitivamente a gliomas de alto grado a través de antígenos inducidos por estrés (es decir, ligandos de NKG2D) expresados por el tumor (3, 27, 28). Se ha demostrado tanto la citotoxicidad *in vitro* como una supervivencia mejorada/mayor tiempo hasta la progresión en modelos específicos *in vivo* diseñados para replicar condiciones terapéuticas (1, 2). Los solicitantes han demostrado que TMZ regula por incremento de  
10 manera transitoria la expresión de los ligandos de NKG2D en la superficie de células de glioma y hace que el tumor sea más vulnerable al reconocimiento por las células T  $\gamma\delta$  (4, 8), y la destrucción de las líneas de glioma resistentes a TMZ se ve aumentada por las células T  $\gamma\delta$  modificadas con el gen de MGMT en presencia de concentraciones terapéuticas de TMZ. Mediante la utilización de las composiciones celulares y procedimientos de la presente divulgación, la sincronización de la inmunoterapia celular y la quimioterapia se puede ajustar para maximizar los efectos de ambas. Por lo tanto, la presente divulgación no solo da a conocer composiciones celulares novedosas, tal como se describe, sino también una estrategia de tratamiento contra glioblastoma novedosa, que proporciona una vía no explorada previamente para el tratamiento de gliomas de alto grado.

Aunque es posible administrar la composición celular de la presente divulgación directamente en el lecho tumoral a través de catéteres colocados quirúrgicamente (por ejemplo, un catéter de ventriculostomía), el intervalo de tiempo entre la resección y la intensificación de la dosis de TMZ puede extenderse hasta ocho semanas, exponiendo al paciente al riesgo potencial de infección o a un procedimiento adicional para la colocación del catéter próximo al momento de la administración de la terapia celular. Los CAR incorporados en las composiciones celulares descritas están modificados para reconocer antígenos asociados a tumores (por ejemplo, antígenos asociados a tumores  
25 específicos de glioma) a efectos de concentrar células T DRI-CAR en el tumor cuando se administran al paciente mediante una variedad de procedimientos de administración, permitiéndose la utilización de una variedad de procedimientos de administración. Por ejemplo, cuando la composición celular se administra al paciente por vía intravenosa o vía intraarterial, los CAR incorporados en las composiciones celulares descritas ayudan a aumentar la infiltración de las células T DRI-CAR en el lecho tumoral y permiten concentraciones aumentadas de las células T DRI-CAR en el lecho tumoral. Asimismo, cuando se administran por otros medios (por ejemplo, a través de un catéter Rickham o un dispositivo similar directamente en el lecho tumoral o mediante administración intraventricular), los CAR incorporados a las composiciones celulares descritas permiten conseguir el mismo resultado. La activación y la citotoxicidad pueden estar mediadas por el CAR y/o por el reconocimiento de ligandos de NKG2D por las células T  $\gamma\delta$ , una estrategia particularmente importante en un tumor heterogéneo que no expresa TAA con suficiente densidad para activar las células T a través del CAR. De modo importante, esta terapia tiene lugar durante la quimioterapia con dosis elevadas cuando las células tumorales están muy estresadas; se agotan las células T reguladoras, se comprometen otras defensas inmunitarias asociadas con el tumor y el lecho vascular se vuelve más permeable. El agotamiento de linfocitos mediado por TMZ también favorece la reconstitución homeostática, la proliferación *in vivo* y la persistencia de las células T DRI-CAR.

40 En las figuras 8A y 8B, respectivamente, se muestra un resumen de los procedimientos de inmunoterapia de la técnica anterior y los procedimientos mejorados de la presente divulgación. En los procedimientos de la técnica anterior, se generaron células inmunocompetentes mediante el tratamiento con citocinas y otros procedimientos. Las células inmunocompetentes como tales mostraron actividad tumoricida. Cuando se administraron tratamientos adicionales, por ejemplo, regímenes de quimioterapia, se agotaron las células inmunocompetentes, lo que limitó la eficacia del tratamiento debido a la destrucción de las células terapéuticas. Los procedimientos de la presente divulgación superan dichas limitaciones mediante la provisión de composiciones celulares, tales como, pero sin limitarse a las mismas, células T  $\gamma\delta$ , que comprenden un CAR específico del tumor y un factor de supervivencia (DRI-CAR). Cuando se combinan con tratamientos terapéuticos adicionales, tales como regímenes de quimioterapia, las células DRI-CAR conservan la capacidad de atacar las células tumorales en virtud de los CAR presentes, así como a través del reconocimiento de los ligandos inducidos por estrés, a la vez que son capaces de sobrevivir en el entorno de tratamiento. Además, la reducción de las células T reguladoras proporciona una ventaja terapéutica adicional. Aún más, el agotamiento de linfocitos a través del régimen de quimioterapia también favorece la reconstitución homeostática, la proliferación *in vivo* y la persistencia de las células T DRI-CAR, mejorando  
55 adicionalmente los resultados terapéuticos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Desarrollo y prueba in vitro de células T $\gamma\delta$ modificadas genéticamente:

60 Se generarán vectores lentivirales que expresan conjuntamente secuencias de ADNc para un CAR y un factor de supervivencia para conferir resistencia a fármacos para determinar configuraciones de vectores que proporcionen una expresión transgénica óptima y para determinar el tiempo de transducción óptimo para producir células T  $\gamma\delta$  modificadas genéticamente. A efectos de cuantificar la administración y la persistencia óptimas, se evaluará la inmunoterapia de células T  $\gamma\delta$  modificadas genéticamente con células T  $\gamma\delta$  marcadas con  $^{111}\text{[In]}$  que portan un  
65

EGFRvIII o un IL13R $\alpha$  (DRI-CAR) mediante la comparación de la potencia, la persistencia y la eficacia de la vía de administración intracraneal frente a intravenosa contra xenoinjertos de glioma derivadas de pacientes durante la quimioterapia con TMZ en ratones inmunodeficientes.

5 Se generarán vectores que codifican los CAR de IL13R $\alpha$  y EGFRvIII que reconocen células de glioma y se sabe que se dirigen al glioblastoma (GBM). Además, se expresará conjuntamente con el CAR un ADNc que codifica MGMT, que confiere resistencia a TMZ. También se generarán vectores de control que codifican marcadores de flujo o de formación de imágenes para un análisis óptimo de la transferencia de genes y el seguimiento de células modificadas genéticamente. En la figura 1 se muestran ejemplos de construcciones que codifican un CAR de EGFRvIII.

10 El trabajo previo de los inventores ha verificado que el tiempo de transducción óptimo para la inserción de un vector p140K-MGMT codificado por SIV simple es de entre 3 y 7 días después del inicio del cultivo de expansión de células T  $\gamma\delta$  basado en Zoledronato/IL2. En estas condiciones, se generaron números de copias de MGMT suficientes para conferir resistencia a TMZ en concentraciones superiores a 400  $\mu$ M con un MOI de tan solo 5. Estas condiciones se verificarán y optimizarán para las transducciones DRI-CAR utilizando una matriz de tiempos de transducción y MOI que abarca los días 2 a 7 y MOI de 1 a 25.

**Tabla 1: Diseño experimental**

Grupo	n	Tumor	Tratamiento (véase la figura 2)
1	20	Sí	Sin tratamiento
2	20	Sí	TMZ 60 mg/kg IP
3	20	Sí	células T $\gamma\delta$ modificadas genéticamente IV ( $1,5 \times 10^8$ /kg), TMZ 60 mg/kg IP
4	20	Sí	células T $\gamma\delta$ modificadas genéticamente IC ( $1,5 \times 10^6$ ), TMZ 60 mg/kg IP

20 Los xenoinjertos de glioma intracraneal consistirán en clones originales (designados por "P") y resistentes a TMZ (designados por "T") de los explantes de GBM-X12 (clásico), GBM-X22 (mesenquimatoso), GBM-X1066 (neural) y GBM-XD456 (proneural) de GBM primario. A los ratones se les inyectarán  $1,5 \times 10^6$  células/kg (intracraneal) o  $5 \times 10^8$  células/kg (intravenosa) de células T  $\gamma\delta$  DRI-CAR marcadas con  $^{111}$ [In] utilizando procedimientos desarrollados por Beck (5) y diversos tratamientos evaluados en base al diseño experimental que se muestra en la tabla 1 (IC = intracraneal; IP = intraperitoneal; IV = intravenoso) y la figura 2. Se llevarán a cabo estudios de obtención de imágenes a intervalos de 24 horas durante un mínimo de 3 días después de la inyección mediante X-SPECT, tal como se modeliza para los tumores de mama en la figura 3. Los estudios de biodistribución también se realizarán por separado 24 horas después de la inyección de  $5 \times 10^8$  células/kg de células T  $\gamma\delta$  marcadas con  $^{111}$ [In]/kg y el recuento de los órganos principales y tumor con resultados expresados como el % de dosis inyectada (DI) con  $^{111}$ [In]/g. La localización tumoral de las células T  $\gamma\delta$  se derivará de la escala de colores asociada con la imagen y se cuantificará mediante la radiactividad acumulada dentro del tumor expresada (por convención) como el porcentaje de dosis de radiación inyectada hallada por gramo de tumor. Se espera que la administración intravenosa, así como la administración intracraneal, sean eficaces.

35 La potencia de cada producto DRI-CAR se determinará con ensayos de citotoxicidad *in vitro* frente a las cuatro xenolíneas seleccionadas. La eficacia se evaluará mediante la comparación de la supervivencia de los ratones portadores de tumores tratados en base al diseño experimental que se muestra en la tabla 1 y la figura 2 con los controles no tratados. Se recogerán tejidos tumorales y normales para evaluaciones histológicas y funcionales que incluyen histopatología del tumor, invasión, infiltración de linfocitos e inmunofenotipo de linfocitos. El análisis estadístico se realizará utilizando pruebas de la t no paramétricas y/o ANOVA para estudios de migración y distribución, así como un análisis de rango logarítmico no paramétrico de datos de supervivencia. Proyectando una diferencia de 0,15 entre los grupos de tratamiento y de control, 20 réplicas/grupo proporcionan una potencia del 80 % para detectar diferencias a  $p \leq 0,05$ .

45 Ejemplo 2: Evaluación de la seguridad de la terapia con DRI-CAR en condiciones que probablemente prevalecerán durante el tratamiento (por ejemplo, radioterapia previa, TMZ)

50 Las composiciones celulares y los procedimientos de la presente divulgación se probarán para determinar el potencial de citotoxicidad local fuera de la diana utilizando un ensayo de toxicología *in vitro* de DRI-CAR frente a astrocitos humanos cultivados. Además, se determinará si las células T  $\gamma\delta$  que expresan un gen suicida confieren ventajas de seguridad que se considerarían ventajosas. También se determinará el análisis del sitio de integración vectorial. Se llevará a cabo un análisis toxicológico *in vitro*, ya que no existe un modelo animal comparable para las células T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Las células T DRI-CAR (20 repeticiones) se probarán frente a astrocitos humanos cultivados expuestos a 250 cGy de radiación ionizante o una incubación de 4 horas en TMZ 200  $\mu$ M y se compararán con astrocitos no tratados mediante la evaluación de la expresión del ligando de NKG2D y la citotoxicidad mediada por células DRI-CAR. El trabajo inicial revela una ligera regulación por incremento de MIC-A y ULBP2 y ninguna citotoxicidad significativa de células T  $\gamma\delta$  frente a astrocitos cultivados.

60 A efectos de proteger frente a una respuesta inflamatoria en cascada o una citotoxicidad fuera de la diana, se evaluará un gen suicida para su incorporación en el producto génico de CAR. El  $\gamma$ -retrovirus,

SFG.iCaspasa9.2A.DeltaCD19, consiste en iC9 unida, a través de una secuencia similar a 2A, a CD19 humano truncado que sirve como marcador seleccionable. La activación inducible por AP1903 del gen suicida de Caspasa 9 se consigue mediante la expresión de una proteína quimérica (iC9), fusionada a un dominio de unión a fármaco derivado de la proteína de unión a FK506 humana (FKBP). La iC9 permanece inactiva dentro de las células hasta que se expone a AP1903, que entrecruza los dominios de FKBP, inicia la señalización de iCasp9 e induce la apoptosis de las células modificadas genéticamente. El gen y AP1903 serán suministrados por Bellicum Pharmaceuticals (Houston, TX), que también ayudará con los estudios funcionales. La utilización de esta construcción ha sido descrita (6, 7) y se utilizará para llevar a cabo estudios funcionales en ratones NSG para optimizar la dosificación para inducir una apoptosis rápida en células T DRI-CAR sistémicas e intracraneales.

El análisis de integración del sitio de lentivirus se realizará inicialmente en el laboratorio de los inventores utilizando el sistema Lenti-X™ (Clontech) utilizando la tecnología GenomeWalker.

Ejemplo 3: Estandarización de los criterios de fabricación y liberación de células para la utilización de DRI-CAR para terapia humana. Los ensayos de citotoxicidad (potencia y toxicología), el análisis de la composición del injerto mediante citometría de flujo y las pruebas de enfermedades infecciosas para la fabricación de células con GMPc que permitirán la traducción a ensayos clínicos. Para los productos de terapia celular y génica, se requieren los criterios de liberación definidos por la FDA en 21 CFR 211.165 y 610 para esterilidad, pureza, identidad y potencia. La FDA exige procedimientos para las pruebas de esterilidad. Las pruebas de identidad se realizarán mediante la tipificación clínica de HLA. La pureza/composición del producto celular y las pruebas de potencia requerirán estandarización en el laboratorio de los inventores. El reglamento de la FDA 21 CFR 600.3 requiere que la capacidad específica de un producto para funcionar tal como se indica, debe definirse mediante una prueba de laboratorio adecuada, y el 21 CFR 610.10 establece que la evaluación de la potencia debe consistir en pruebas *in vitro* y/o *in vivo* diseñadas específicamente para el producto. La FDA también recomienda que la citotoxicidad se correlacione con el fenotipo diana; por lo tanto, la citotoxicidad se validará utilizando una línea de células de glioma diana definida con un número constante de pases como norma para la evaluación de la función del injerto DRI-CAR según los requisitos clínicos definidos en la ley de mejora de laboratorios clínicos de 1988 (CLIA, *Clinical Laboratory Improvement Act*) para pruebas desarrolladas en laboratorio. La función óptima se definirá de manera provisional como el 50 % de destrucción en una proporción de E:D (efector:diana) de 20:1. Los astrocitos cultivados servirán como dianas negativas y las células de eritroleucemia K562 como dianas positivas. La pureza final y la composición se evaluarán mediante citometría de flujo para el % de células T totales (CD3), el % de células T  $\gamma\delta$ , el % células T  $\alpha\beta$  (CD3+CD4+ $\gamma\delta$ - y el % de CD3+CD8+ $\gamma\delta$ -), el % de células NK (CD16/56), el % de células B (CD19) y el % de monocitos (CD14). Los criterios de liberación diana son  $\geq 60$  % de células T  $\gamma\delta$ ,  $\leq 5$  % de células T  $\alpha\beta$  y  $\leq 25$  % de células NK. El análisis estadístico consistirá en establecer una media, una DE y un IC del 95 % para los fenotipos celulares individuales en el análisis de pureza/composición y para cada % de destrucción para cada proporción E:D en el ensayo funcional en un mínimo de 20 ensayos. Se utilizará ANOVA para comparar las diferencias en las proporciones E:D individuales entre los grupos. Se incorporarán la función citotóxica *in vitro*, así como los estudios de migración y los resultados de supervivencia en modelos animales.

Ejemplo 4: Evaluación de la seguridad, toxicidad, tráfico y potencial de migración de células T  $\gamma\delta$  CAR-DRI marcadas con  $^{111}\text{In}$  como terapia celular posterior a la resección en tres pacientes con glioblastoma primario en un ensayo clínico de fase 0.

Se realizará un pequeño número de experimentos iniciales utilizando células T DRI-CAR marcadas con  $^{111}\text{In}$  para verificar la resistencia a TMZ en condiciones clínicas y la migración a áreas potenciales de enfermedad microscópica residual. Este estudio se llevará a cabo como un ensayo clínico de fase 0 en el que la toxicidad es el criterio de valoración de interés principal. Los pacientes elegibles ingresarán de manera secuencial y se les administrará una infusión. Las frecuencias de los efectos secundarios se resumirán mediante el sistema corporal, grado y causalidad utilizando frecuencias y porcentajes. Se proporcionará una lista de sujetos individuales que incluye la información anterior, más el día del estudio del inicio de los síntomas y la duración del acontecimiento adverso. No se realizarán comparaciones estadísticas. Los objetivos secundarios incluirán la supervisión con el tiempo hasta la progresión, la presencia de quimerismo hematopoyético sistémico temprano y tardío, la función inmunológica sistémica y la supervivencia general con el fin de generar hipótesis y diseñar ensayos clínicos de fase I y II. Se inscribirán hasta 3 pacientes evaluables que consisten en hombres adultos y mujeres no embarazadas, como mínimo, de 18 años de edad sometidos a resección por un GBM primario confirmado histológicamente. Los pacientes se someterán a una sola leucaféresis después de la resección y antes del inicio de la terapia con RT (radioterapia) + TMZ para la fabricación de DRI-CAR. Se administrará una sola dosis de  $1 \times 10^6$  células T DRI-CAR/kg durante la terapia con TMZ a dosis elevadas después del período de descanso al final de la combinación de RT+TMZ. Una parte del producto celular se marcará con  $^{111}\text{In}$  para seguir la migración de las células. Se realizará una tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT, *single photon emission computerized tomography*) 12, 24 y 48 horas después de la infusión. Un solo médico experimentado en medicina nuclear revisará todas las imágenes planares y SPECT de leucocitos marcados con  $^{111}\text{In}$ -oxina corregidas por atenuación. Se realizará un seguimiento de los pacientes individuales, como mínimo, durante 30 días para detectar toxicidad antes de inscribir al siguiente paciente. Se utilizarán los criterios comunes de toxicidad del programa de evaluación de la terapia contra el cáncer para clasificar los acontecimientos adversos para definir cualquier toxicidad de grado 3 o 4 que afecte al hígado, los pulmones y el corazón, o cualquier otra toxicidad de grado 4 como toxicidad limitante de la dosis (DLT, *dose-limiting*

*toxicity*), si se considera posible o probablemente relacionado con las células T DRI-CAR. Entre los acontecimientos adicionales importantes que se considerarán DLT si están posible o probablemente relacionados se incluyen muerte, accidente cerebrovascular, hematoma que requiere cirugía, deterioro neurológico intratable, infección sistémica que no responde y enfermedad de injerto contra huésped. La presunta toxicidad fuera de la diana o acontecimientos intracraneales, tales como inflamación o leucoencefalopatía, desencadenarán la administración de API 903 para activar la apoptosis de células T DRI-CAR a través del gen suicida *iC9*.

#### Ejemplo 5: Expresión de antígenos inducidos por estrés

Los ligandos inducidos por estrés seleccionados (NKG2DL) en xenoinjertos de glioma se regulan por incremento después de la exposición a TMZ (figura 4A). La figura 4 muestra la expresión de los NKG2DL MIC-A, MIC-B, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3 y ULBP-4 en los xenoinjertos de glioma X12T y X22T. Los xenoinjertos de glioma X12T muestran expresión de MIC-A, ULBP-1 y ULBP-4 con una regulación por incremento mínima después del tratamiento con TMZ 400  $\mu$ M durante 4 horas. Los xenoinjertos de glioma X22T muestran expresión de MIC-A, MIC-B, ULBP-1 y ULBP-4 con regulación por incremento de MIC-A y ULBP-4 después del tratamiento con TMZ 400  $\mu$ M durante 4 horas. Las células T  $\gamma\delta$  expandidas/activadas ex vivo fueron eficaces para destruir células derivadas de los xenoinjertos de glioma X12T y X22T, tal como se muestra en la figura 4B. 4. Se cultivaron células T  $\gamma\delta$  modificadas para expresar un factor de supervivencia para la resistencia a TMZ a proporciones crecientes de efector:diana (E:D) con células derivadas de los xenoinjertos de glioma X12T y X22T y el porcentaje de lisis (determinado mediante la proporción de células vivas con respecto a células muertas según se determina mediante citometría de flujo) se expresó en función de la proporción E:D. A proporciones E:D superiores a 10:1, las células T  $\gamma\delta$  fueron citotóxicas para las células derivadas de xenoinjertos de glioma X12T y X22T. Las células T  $\gamma\delta$  no mostraron evidencia de toxicidad frente a astrocitos humanos cultivados a una proporción E:D de 20:1.

#### Ejemplo 6: La eficacia de la terapia con células T $\gamma\delta$ aumenta mediante la expresión de antígenos inducidos por estrés

La expresión de NKG2DL en células tumorales aumenta la potencia global de la terapia con células T  $\gamma\delta$ . Las figuras 5A y 5B muestran la supervivencia de ratones portadores de los gliomas X12P y X12T (resistentes a TMZ), respectivamente, en respuesta a diversos tratamientos. La figura 5A muestra la supervivencia de ratones portadores del glioma X12P tratados con TMZ sola (TMZ), la combinación de TMZ más una composición que comprende células T  $\gamma\delta$  y células NK modificadas para expresar un factor de supervivencia para la resistencia a TMZ (DRI), ratones que reciben células T  $\gamma\delta$  sin modificar y células NK (CT) y en ratones de control que no recibieron tratamiento. El régimen de tratamiento con TMZ (azul) y el régimen de tratamiento con DRI (rojo) aumentaron la supervivencia de los ratones portadores del glioma X12P en comparación con el régimen de tratamiento con CT (verde) y los ratones no tratados (negro) ( $p < 0,001$ ). El régimen de tratamiento con DRI aumentó la mediana de supervivencia de 57 a 75 días en comparación con el régimen de tratamiento con TMZ. La figura 5B muestra la supervivencia de ratones portadores del glioma X12T tratados tal como se describe en la figura 5A. El régimen de tratamiento con DRI (rojo) aumentó la supervivencia en ratones portadores del glioma X12T en comparación con ratones no tratados (negro) ( $p = 0,0147$ ). El régimen de tratamiento con TMZ no mejoró la supervivencia en ratones portadores del glioma X12T en comparación con los ratones no tratados, tal como se esperaba. El régimen de tratamiento con DRI aumentó la mediana de supervivencia de 22 a 27 días en comparación con el régimen de tratamiento con TMZ. El efecto del régimen de tratamiento con DRI podría incrementarse mediante la intensificación de la administración de células T  $\gamma\delta$  y células NK desde una sola administración por semana (tal como se muestra en la figura 2) hasta dos administraciones por semana (datos no mostrados). En esta administración modificada, el régimen de tratamiento con DRI aumentó la supervivencia en ratones portadores del glioma X12T en comparación con ratones no tratados ( $p = 0,0004$ ) y aumentó la mediana de supervivencia de 22 a 38 días en comparación con el régimen de tratamiento con TMZ.

#### Ejemplo 7: Los antígenos inducidos por el estrés no están regulados por incremento en el tejido cerebral normal

La observación del tejido de tumor cerebral metastásico irradiado y el tejido cerebral normal adyacente revela una regulación por incremento del antígeno inducido por estrés (ligando de NKG2D) en el tejido tumoral esencialmente sin expresión en el tejido cerebral circundante normal (es decir, no tumoral) (figura 6). La figura 6 muestra la expresión de antígenos inducidos por estrés del tejido de tumor cerebral metastásico irradiado y el tejido cerebral normal adyacente. El tejido de tumor cerebral metastásico mostró una fuerte expresión de ULBP-1 y una expresión leve de ULBP-2 y ULBP-3. No se observó expresión de antígenos inducidos por estrés en el tejido cerebral normal adyacente. Por tanto, no son probables efectos fuera de la diana y la lesión resultante en el tejido cerebral normal por las composiciones celulares descritas en el presente documento.

#### Ejemplo 8: Los antígenos inducidos por el estrés no se regulan por incremento mediante tratamiento con radiación

De manera similar, el antígeno inducido por estrés (ligando de NKG2D) no se regula por incremento en el cerebro de ratón irradiado ni son visibles otros signos de inflamación (figura 7). La figura 7 muestra el cerebro completo de ratones WT C56BL/6 (paneles *b*, *d*) irradiados utilizando un par de haces anterior-posterior y posterior-anterior de

rayos X de 160 kV a una dosis de 17 Gy y ratones de control (paneles a, c) que no recibieron radiación. Se sacrificaron los ratones y se recogieron los cerebros a los 70 días. Los paneles a y b comparan la tinción con MULT-1 del antígeno por estrés entre ratones de control e irradiados. Los paneles c y d comparan la tinción con anticuerpo contra CD3 entre ratones de control e irradiados. Los ratones irradiados son negativos para MULT-1 y anticuerpo contra CD3, lo que demuestra que los antígenos inducidos por estrés no están regulados por incremento en respuesta al tratamiento con radiación en tejido cerebral normal y la infiltración de linfocitos no está inducida en respuesta al tratamiento con radiación en tejido cerebral normal.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Bryant NL, Suarez-Cuervo C, Gillespie GY, Markert JM, Nabors LB, Meleth S, Lopez RD, Lamb LS, Jr. Characterization and immunotherapeutic potential of gammadelta T-cells in patients with glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2009;11(4):357-67. PubMed PMID: 19211933; PubMed Central PMCID: PMC2743216.
2. Lamb LS, Jr. gammadelta T cells as immune effectors against high-grade gliomas. *Immunol Res.* 2009;45(1):85-95. PubMed PMID: 19711198.
3. Bryant NL, Gillespie GY, Lopez RD, Markert JM, Cloud GA, Langford CP, Arnouk H, Su Y, Haines HL, Suarez-Cuervo C, Lamb LS, Jr. Preclinical evaluation of ex vivo expanded/activated gammadelta T cells for immunotherapy of glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology.* 2011;101(2):179-88. Epub 2010/06/10. doi:10.1007/s11060-010-0245-2. PubMed PMID: 20532954.
4. Lamb LS, Jr., Bowersock J, Dasgupta A, Gillespie GY, Su Y, Johnson A, Spencer HT. Engineered drug resistant gammadelta T cells kill glioblastoma cell lines during a chemotherapy challenge: a strategy for combining chemo and immunotherapy. *PLoS One.* 2013;8(1):e51805. Epub 2013/01/18. doi: 10.1371/journal.pone.0051805. PubMed PMID: 23326319; PubMed Central PMCID: PMC3543433.
5. Beck BH, Kim HG, Kim H, Samuel S, Liu Z, Shrestha R, Haines H, Zinn K, Lopez RD. Adoptively transferred ex vivo expanded gammadelta-T cells mediate in vivo antitumor activity in preclinical mouse models of breast cancer. *Breast cancer research and treatment.* 2010;122(1):135-44. Epub 2009/09/19. doi: 10.1007/s10549-009-0527-6. PubMed PMID: 19763820; PubMed Central PMCID: PMC2883655.
6. Zhou X, Di Stasi A, Tey SK, Krance RA, Martinez C, Leung KS, Durett AG, Wu MF, Liu H, Leen AM, Savoldo B, Lin YF, Grilley BJ, Gee AP, Spencer DM, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK, Dotti G. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. *Blood.* 2014;123(25):3895-905. Epub 2014/04/23. doi: 10.1182/blood-2014-01-551671. PubMed PMID: 24753538; PubMed Central PMCID: PMC4064331.
7. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, Straathof K, Liu E, Durett AG, Grilley B, Liu H, Cruz CR, Savoldo B, Gee AP, Schindler J, Krance RA, Heslop HE, Spencer DM, Rooney CM, Brenner MK. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med.* 2011;365(18):1673-83. Epub 2011/11/04. doi: 10.1056/NEJMoa1106152. PubMed PMID: 22047558; PubMed Central PMCID: PMC3236370.
8. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(1):59-73. PubMed PMID: 18097448.
9. Lake RA, Robinson BW. Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(5):397-405. Epub 2005/05/03. doi: nrc1613 [pii] 10.1038/nrc1613. PubMed PMID: 15864281.
10. van der Most RG, Robinson BW, Lake RA. Combining immunotherapy with chemotherapy to treat cancer. *Discov Med.* 2005;5(27):265-70. Epub 2005/06/01. PubMed PMID 20704886.
11. Ramakrishnan R, Assudani D, Nagaraj S, Hunter T, Cho HI, Antonia S, Altiock S, Celis E, Gabrilovich DI. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2010;120(4):1111-24. Epub 2010/03/18. doi: 10.1172/JCI40269. PubMed PMID: 20234093; PubMed Central PMCID: PMC2846048.
12. Gulley JL, Madan RA, Arlen PM. Enhancing efficacy of therapeutic vaccinations by combination with other modalities. *Vaccine.* 2007;25 Suppl 2:B89-96. Epub 2007/06/19. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.04.091. PubMed PMID: 17573164; PubMed Central PMCID: PMC2062504.
13. Fridlender ZG, Sun J, Singhal S, Kapoor V, Cheng G, Suzuki E, Albelda SM. Chemotherapy delivered after viral immunogene therapy augments antitumor efficacy via multiple immune-mediated mechanisms. *Mol Ther.* 2010;18(11):1947-59. Epub 2010/08/05. doi: 10.1038/mt.2010.159. PubMed PMID: 20683443; PubMed Central PMCID: PMC2990510.
14. Arlen PM, Gulley JL, Parker C, Skarupa L, Pazdur M, Panicali D, Beetham P, Tsang KY, Grosenbach DW, Feldman J, Steinberg SM, Jones E, Chen C, Marte J, Schlom J, Dahut W. A randomized phase II study of concurrent docetaxel plus vaccine versus vaccine alone in metastatic androgen-independent prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2006;12(4):1260-9. Epub 2006/02/21. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2059. PubMed PMID: 16489082; PubMed Central PMCID: PMC1526707.
15. Ramakrishnan R, Antonia S, Gabrilovich DI. Combined modality immunotherapy and chemotherapy: a new perspective. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(10):1523-9. Epub 2008/05/20. doi: 10.1007/s00262-008-0531-4. PubMed PMID: 18488219.
16. Mitchell MS. Combinations of anticancer drugs and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52(11):686-92. Epub 2003/08/28. doi: 10.1007/s00262-003-0427-2. PubMed PMID: 12942200.
17. Antonia SJ, Mirza N, Fricke I, Chiappori A, Thompson P, Williams N, Bepler G, Simon G, Janssen W, Lee JH, Menander K, Chada S, Gabrilovich DI. Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with

- extensive stage small cell lung cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(3 Pt 1):878-87. Epub 2006/02/10. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2013. PubMed PMID: 16467102.
- 5 18. Merchant RE, Baldwin NG, Rice CD, Bear HD. Adoptive immunotherapy of malignant glioma using tumor sensitized T lymphocytes. *Neurol Res*. 1997;19(2):145-52. PubMed PMID: 9175143.
19. Plautz GE, Barnett GH, Miller DW, Cohen BH, Prayson RA, Krauss JC, Luciano M, Kangisser DB, Shu S. Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas. *J Neurosurg*. 1998;89(1):42-51. PubMed PMID: 9647171.
- 10 20. Kruse CA, Cepeda L, Owens B, Johnson SD, Stears J, Lillehei KO. Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother*. 1997;45(2):77-87. PubMed PMID: 9390198.
21. Read SB, Kulprathipanja NV, Gomez GG, Paul DB, Winston KR, Robbins JM, Kruse CA. Human alloreactive CTL interactions with gliomas and with those having upregulated HLA expression from exogenous IFN-gamma or IFN-gamma gene modification. *J Interferon Cytokine Res*. 2003;23(7):379-93. PubMed PMID: 14511464.
- 15 22. Merchant RE, Ellison MD, Young HF. Immunotherapy for malignant glioma using human recombinant interleukin-2 and activated autologous lymphocytes. A review of pre-clinical and clinical investigations. *J Neurooncol*. 1990;8(2):173-88.
23. Barba D, Saris SC, Holder C, Rosenberg SA, Oldfield EH. Intratumoral LAK cell and interleukin-2 therapy of human gliomas. *J Neurosurg*. 1989;70(2): 175-82. PubMed PMID: 2643685.
- 20 24. Saris SC, Patronas NJ, Rosenberg SA, Alexander JT, Frank J, Schwartzentruber DJ, Rubin JT, Barba D, Oldfield EH. The effect of intravenous interleukin-2 on brain water content. *J Neurosurg*. 1989;71(2):169-74. PubMed PMID: 2787395.
- 25 25. Hayes RL, Koslow M, Hiesiger EM, Hymes KB, Hochster HS, Moore EJ, Pierz DM, Chen DK, Budzilovich GN, Ransohoff J. Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma. *Cancer*. 1995;76(5):840-52. PubMed PMID: 8625188.
26. Dillman RO, Duma CM, Schiltz PM, DePriest C, Ellis RA, Okamoto K, Beutel LD, De Leon C, Chico S. Intracavitary placement of autologous lymphokine-activated killer (LAK) cells after resection of recurrent glioblastoma. *J Immunother*. 2004;27(5):398-404. PubMed PMID: 15314549.
- 30 27. Wu J, Groh V, Spies T. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *J Immunol*. 2002;169(3):1236-40. PubMed PMID: 12133944.
28. Poggi A, Carosio R, Fenoglio D, Brenci S, Murdaca G, Setti M, Indiveri F, Scabini S, Ferrero E, Zocchi MR. Migration of V delta 1 and V delta 2 T cells in response to CXCR3 and CXCR4 ligands in healthy donors and HTV-1-infected patients: competition by HIV-1 Tat. *Blood*. 2004;103(6):2205-13. PubMed PMID: 14630801.
- 35 29. Krebs S, Rodríguez-Cruz TG, DeRenzo C, Gottschalk S. Genetically modified T cells to target glioblastoma. *Front. Oncol.*, 2013, 3:322.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición celular que comprende células T  $\gamma\delta$  que expresan, como mínimo:

5 un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a un antígeno tumoral, comprendiendo el endodominio del CAR, como mínimo, un dominio de señalización;  
 un receptor para un antígeno inducido por estrés; y  
 un factor de supervivencia que permite que las células T  $\gamma\delta$  que expresan el CAR sobrevivan en un entorno de  
 10 tratamiento resultante de un agente terapéutico adicional, para la utilización en el tratamiento del cáncer en un sujeto mediante la administración antes de la administración del agente terapéutico adicional al sujeto, después de la administración del agente terapéutico adicional al sujeto, simultáneamente con la administración del agente terapéutico adicional al sujeto o cualquier combinación de las anteriores.

15 2. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1, en la que el endodominio del CAR comprende solo un dominio de señalización.

3. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición celular es para administración, como mínimo, una vez más al sujeto.

20 4. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 3, en la que el agente terapéutico adicional se administra antes de la administración de la, como mínimo, una administración adicional de la composición celular al sujeto, después de la administración de la, como mínimo, una administración adicional de la composición celular al sujeto, simultáneamente con la administración de la, como mínimo, una administración adicional de la composición celular al sujeto o cualquier combinación de las anteriores.

25 5. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:

(1) la composición celular es para la administración al sujeto el día X y el agente terapéutico adicional es para la administración al sujeto de 12 a 72 horas antes del día X, de 12 a 72 horas después del día X o de 12 a 72 horas tanto antes como después del día X; o

(2) la composición celular es para la administración al sujeto el día X y el agente terapéutico adicional es para la administración al sujeto de 12 a 72 horas antes del día X, de 12 a 72 horas después del día X o de 12 a 72 horas tanto antes como después del día X, seguido de una administración adicional de la composición celular al sujeto el día Y, con administración opcional del agente terapéutico adicional al sujeto de 12 a 72 horas antes del día Y, de 12 a 72 horas después del día Y o de 12 a 72 horas tanto antes como después del día Y.

6. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:

(1) el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer epitelial, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cánceres de las vías genitourinarias, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de riñón, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cánceres de las vías biliares, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de tiroides y neoplasias malignas hematológicas, leucemia, linfoma, mieloma múltiple y síndromes mielodisplásicos;

(2) el cáncer se selecciona del grupo que consiste en tumores pineales, tumores hipofisarios, PNET, schwannoma, linfoma, meduloblastoma, meningioma, cáncer cerebral metastásico, neurofibroma, tumores neuronales y mixtos neuronales-gliales, oligoastrocitoma, oligodendroglioma, astrocitoma, tumor rabdoide teratoide atípico (TRTA), condrosarcoma, tumores del plexo coroideo, craneofaringioma, endimoma, tumor de células germinales, neuroblastoma, glioblastoma y glioma;

(3) el cáncer es sensible al agente terapéutico adicional; o

(4) el cáncer es resistente al agente terapéutico adicional.

7. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en EphA2, antígeno de maduración de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, CAIX, CA9, CD22, CD19, CD20, ROR1, cadena kappa o ligera, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, CA-125, glicoproteína-3, antígeno tumoral epitelial, antígeno asociado a melanoma, EGP2, EGP40, EPCAM, ERBB3, ERBB4, ErbB3/4, PAP, FAR, FBP, AchR fetal, receptor  $\alpha$  de folato, p53 mutado, ras mutado, HER2, ERBB2, HER3, proteína de unión a folato, glicoproteína gp120 de la envoltura de VIH-1, glicoproteína gp41 de la envoltura de VIH-1, 5T4, 8H9, GD2, CD123, CD23, CD33, CD30, CD38, CD56, c-Met, fap, mesotelina, GD3, HERV-K, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ , CSPG4, Lewis-Y, MCSP, Muc1, Muc16, NCAM, ligandos de NKG2D, NY-ES0-1, PRAME, PSCA, PSCI, PSMA, EGFR, Sp17, SURVIVINA, TAG72, TEM1, TEM8, EGFRvIII y VEGFR2.

8. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:

(1) el cáncer es glioblastoma y el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en ligandos de NKG2D,

ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A, MIC-B, EGFRvIII e IL13R $\alpha$ ;

(2) el cáncer es glioblastoma y el antígeno tumoral es EGFRvIII o IL13R $\alpha$ ;

(3) el cáncer es neuroblastoma y el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en ligandos de NKG2D, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A, MIC -B y GD2; o

5 (4) el cáncer es neuroblastoma y el antígeno tumoral es GD2.

9. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:

10 (1) la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  y, como mínimo, una de células T  $\alpha\beta$  y células NK;

(2) la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  y, de manera opcional, células T  $\alpha\beta$  y células NK; o

(3) la composición celular comprende más o igual al 60 % de células T  $\gamma\delta$  y menos o igual al 5 % de células T  $\alpha\beta$  y menos o igual al 25 % de células NK.

15 10. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el receptor para el antígeno inducido por estrés es un receptor NKG2D.

11. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:

20 (1) el agente terapéutico adicional es un análogo de nucleósido, un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico, un inhibidor de la topoisomerasa, un inhibidor mitótico, un agente diferenciador o un agente de terapia hormonal y el factor de supervivencia proporciona resistencia al agente terapéutico adicional;

(2) el factor de supervivencia es O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa, proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos o 5' nucleotidasa II;

25 (3) el agente terapéutico adicional es un agente alquilante y el factor de supervivencia es O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa. temozolomida;

(4) el agente terapéutico adicional es temozolomida y el factor de supervivencia es O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa;

(5) el agente terapéutico adicional proporciona, como mínimo, una de las siguientes ventajas:

30 a. mayor eficacia de la composición celular a través de la inducción de antígenos inducidos por estrés;

b. mayor reconstitución homeostática de la composición celular;

c. mayor proliferación *in vivo* de la composición celular; y

d. mayor persistencia de la composición celular; o

35 (6) el agente terapéutico adicional aumenta la expresión de un antígeno inducido por estrés seleccionado del grupo que consiste en ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A y MIC-B.

12. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:

40 (1) las células T  $\gamma\delta$  están modificadas para expresar el CAR dirigido a un antígeno tumoral y el factor de supervivencia y el receptor para el antígeno inducido por estrés se producen de forma natural en las células T  $\gamma\delta$ ;

(2) las células T  $\gamma\delta$  están modificadas para expresar el CAR dirigido a un antígeno tumoral, el factor de supervivencia y el receptor para el antígeno inducido por estrés;

(3) las células T  $\gamma\delta$  expresan, además, un gen suicida; o

45 (4) las células T  $\gamma\delta$  se han obtenido del sujeto y, de manera opcional, se han expandido *ex vivo*.

13. Composición celular para la utilización, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el agente terapéutico adicional es para la administración simultánea con la administración de la composición celular al sujeto.

50 14. Composición celular que comprende células T  $\gamma\delta$  que expresan, como mínimo:

un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a un antígeno tumoral, en el que el endodominio del CAR comprende solo un dominio de señalización;

un receptor para un antígeno inducido por estrés; y

55 un factor de supervivencia que permite que las células T  $\gamma\delta$  sobrevivan en un entorno de tratamiento creado por un agente terapéutico adicional.

15. Composición celular, según la reivindicación 14, en la que:

60 (1) el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en EphA2, antígeno de maduración de células B (BCMA), B7-H3, B7-H6, CAIX, CA9, CD22, CD19, CD20, ROR1, cadena kappa o ligera, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, CA-125, glicano-3, antígeno tumoral epitelial, antígeno asociado a melanoma, EGP2, EGP40, EPCAM, ERBB3, ERBB4, ErbB3/4, PAP, FAR, FBP, AchR fetal, receptor  $\alpha$  de folato, p53 mutado, ras mutado, HER2, ERBB2, HER3, proteína de unión a folato, glicoproteína gp120 de la envoltura de VIH-1, glicoproteína gp41 de la envoltura de VIH-1, 5T4, 8H9, GD2, CD123, CD23, CD33, CD30, CD38,

65

CD56, c-Met, fap, mesotelina, GD3, HERV-K, IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ , CSPG4, Lewis-Y, MCSP, Muc1, Muc16, NCAM, ligandos de NKG2D, NY-ES0-1, PRAME, PSCA, PSCI, PSMA, EGFR, Sp17, SURVIVINA, TAG72, TEM1, TEM8, EGFRvIII y VEGFR2;

5 (2) el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en ligandos de NKG2D, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A, MIC-B, EGFRvIII e IL13R $\alpha$ ;

(3) el antígeno tumoral es EGFRvIII o IL13R $\alpha$ ;

4) el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en ligandos de NKG2D, ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A, MIC-B y GD2;

(5) el antígeno tumoral es GD2;

10 (6) la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  y, como mínimo, una de células T  $\alpha\beta$  y células NK;

(7) la composición celular comprende células T  $\gamma\delta$  y, de manera opcional, células T  $\alpha\beta$  y células NK;

(8) la composición celular comprende más o igual al 60 % de células T  $\gamma\delta$  y menos o igual al 5 % de células T  $\alpha\beta$  y menos o igual al 25 % de células NK;

15 (9) las células T  $\gamma\delta$  se modifican para expresar el CAR y el factor de supervivencia y, de manera opcional, se modifican para expresar adicionalmente el receptor para el antígeno inducido por estrés, en las que, de manera preferente, el receptor para el antígeno inducido por estrés es un receptor NKG2D; o

(10) las células T  $\gamma\delta$  expresan de forma natural un receptor para un antígeno inducido por estrés, en las que, de manera preferente, el receptor para el antígeno inducido por estrés es un receptor NKG2D.

20 16. Composición celular, según la reivindicación 14, en la que:

(1) el agente terapéutico adicional es un análogo de nucleósido, un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico, un inhibidor de la topoisomerasa, un inhibidor mitótico, un agente diferenciador o un agente de terapia hormonal y el factor de supervivencia proporciona resistencia al agente terapéutico adicional;

25 (2) el factor de supervivencia es O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa, proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos 1 o 5' nucleotidasa II;

(3) el agente terapéutico adicional es un agente alquilante y el factor de supervivencia es O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa;

30 (4) el agente terapéutico adicional es temozolomida y el factor de supervivencia es O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa;

(5) las células T  $\gamma\delta$  están modificadas para expresar adicionalmente un gen suicida;

(6) el agente terapéutico adicional aumenta la expresión de un antígeno inducido por estrés; o

(7) el agente terapéutico adicional aumenta la expresión de un antígeno inducido por estrés seleccionado del grupo que consiste en ULBP-1, ULBP-2, ULBP-3, ULBP-4, ULBP-5, ULBP-6, MIC-A y MIC-B.

35

17. Composición celular que comprende células T  $\gamma\delta$  que expresan, como mínimo:

un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a un antígeno tumoral seleccionado del grupo que consiste en ligandos de NKG2D, GD2, EGFRvIII e IL13R $\alpha$ , en el que el endodominio del CAR comprende solo un dominio de señalización;

40 un receptor NKG2D; y

O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT),

para la utilización en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en la que la composición celular se administra antes de la administración de un tratamiento terapéutico adicional al sujeto, después de la administración de un tratamiento terapéutico adicional al sujeto, simultáneamente con la administración de un tratamiento terapéutico adicional al sujeto o cualquier combinación de las anteriores, y en la que el tratamiento terapéutico adicional comprende temozolomida.

45

18. Composición celular para la utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13 y 17, o composición celular, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en las que el dominio de señalización es CD3-zeta.

50

FIG. 1A

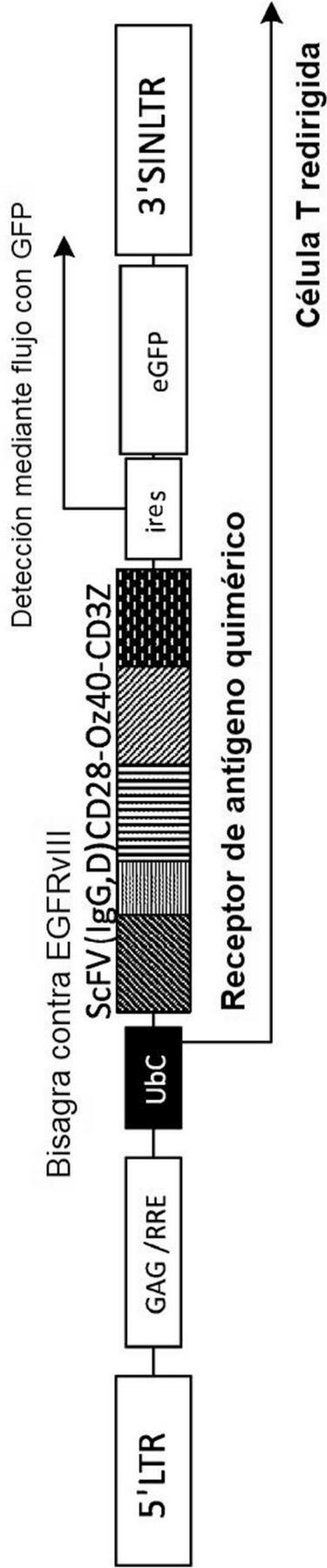


FIG. 1B

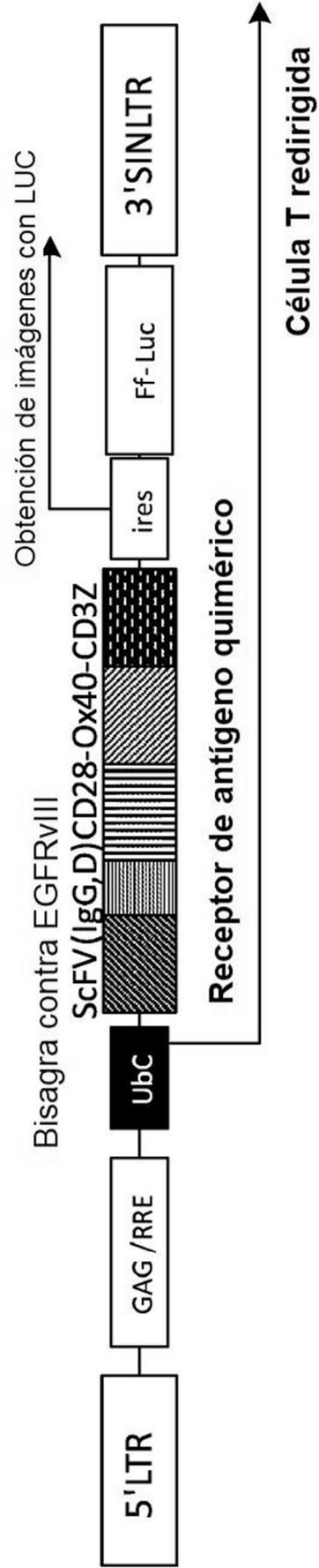


FIG. 1C

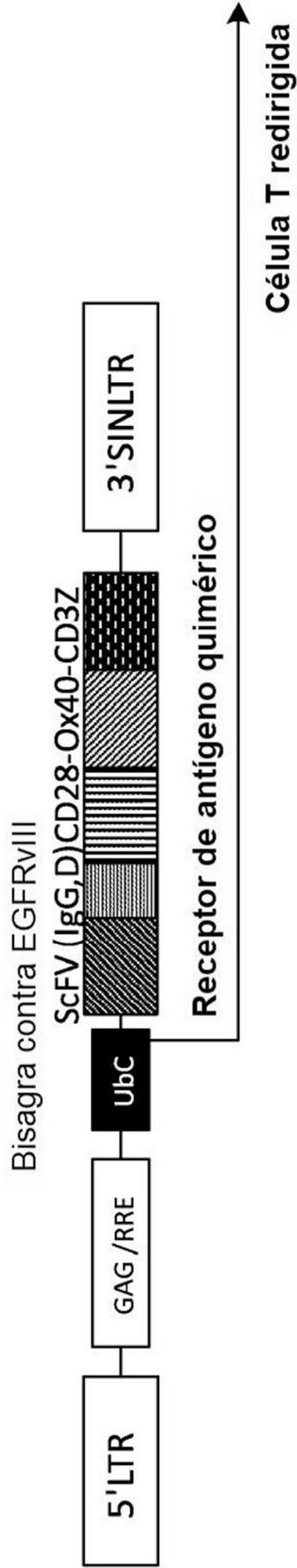


FIG. 1D

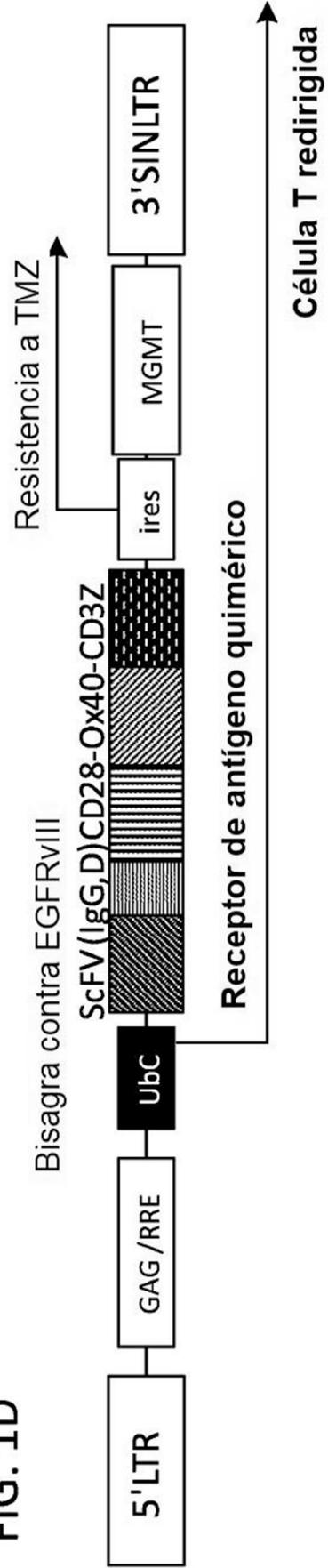




FIG. 3

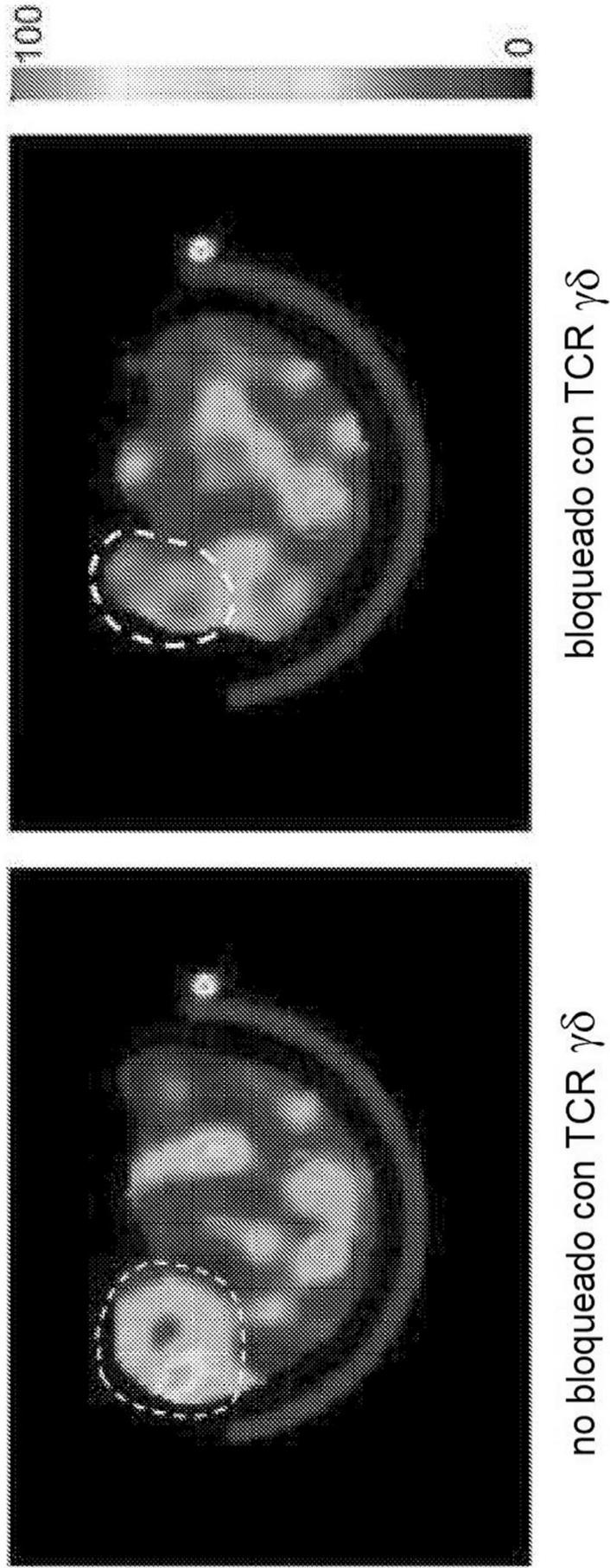


FIG. 4A

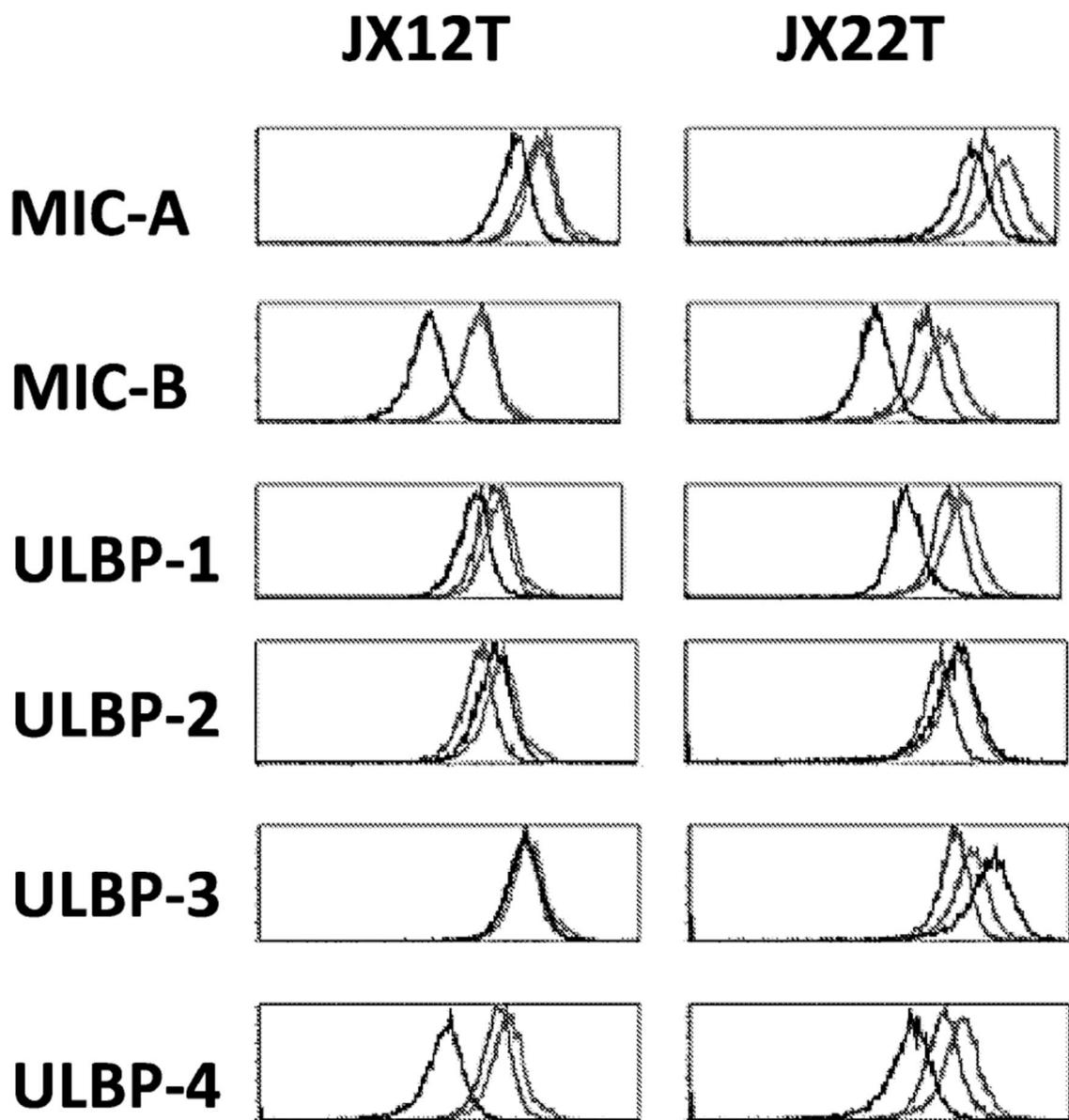
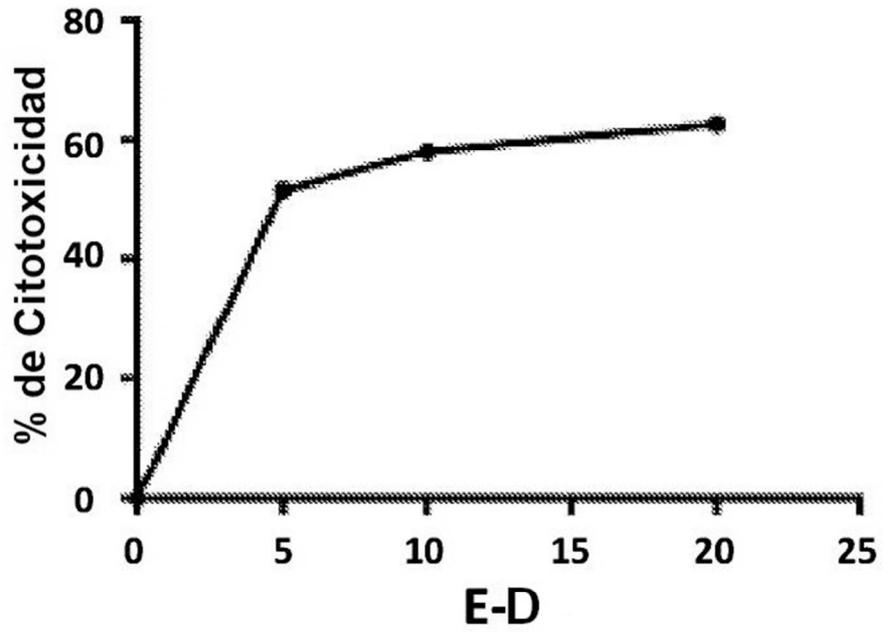


FIG. 4B

**JX12T p22**



**JX22T p27**

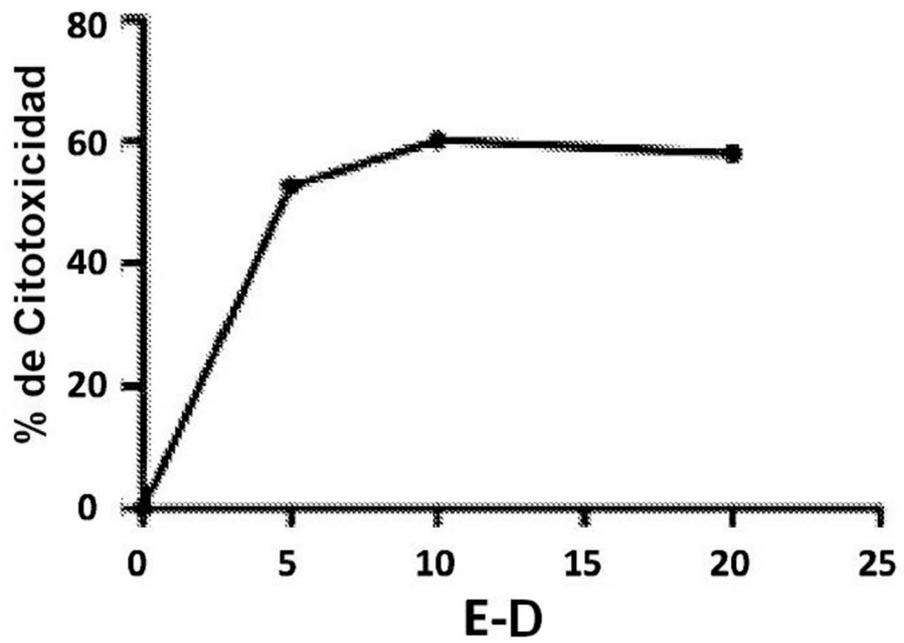


FIG. 5A

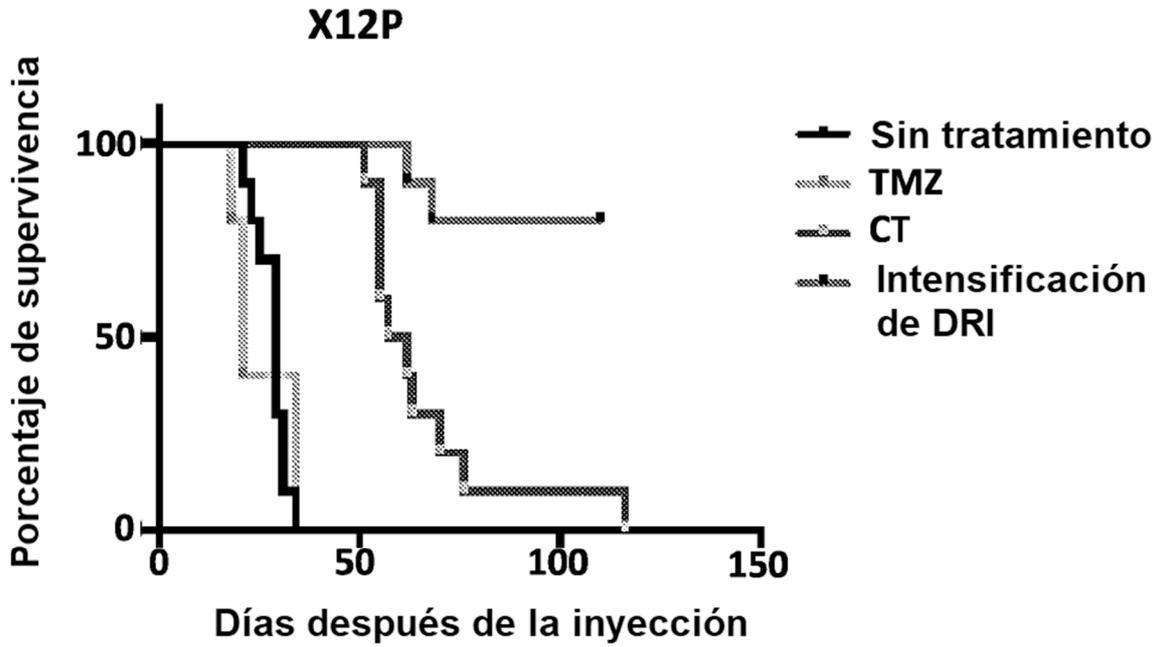


FIG. 5B

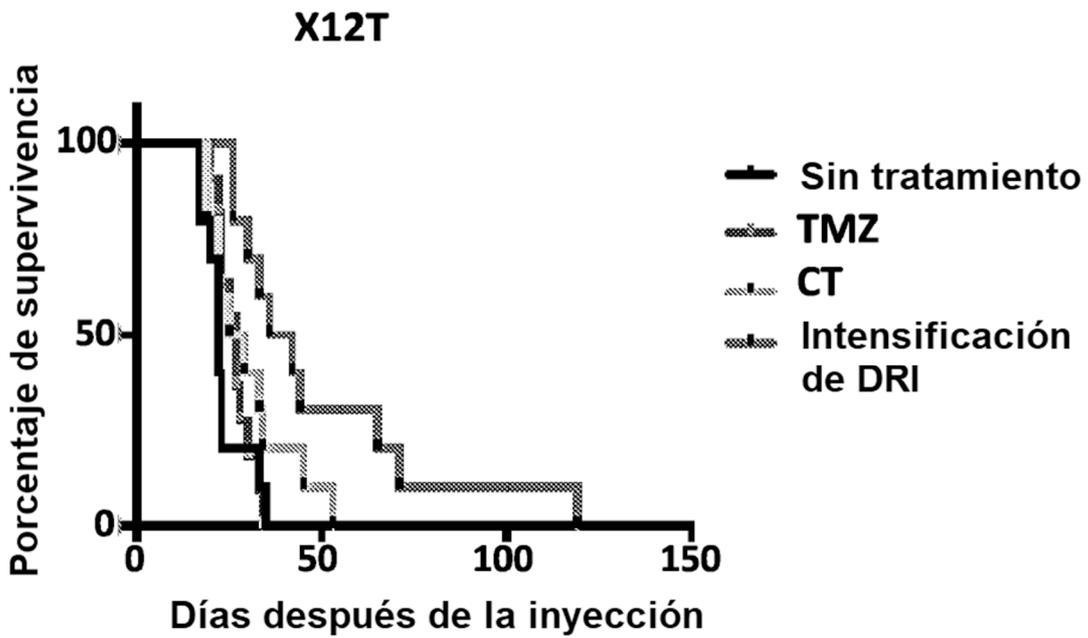


FIG. 6

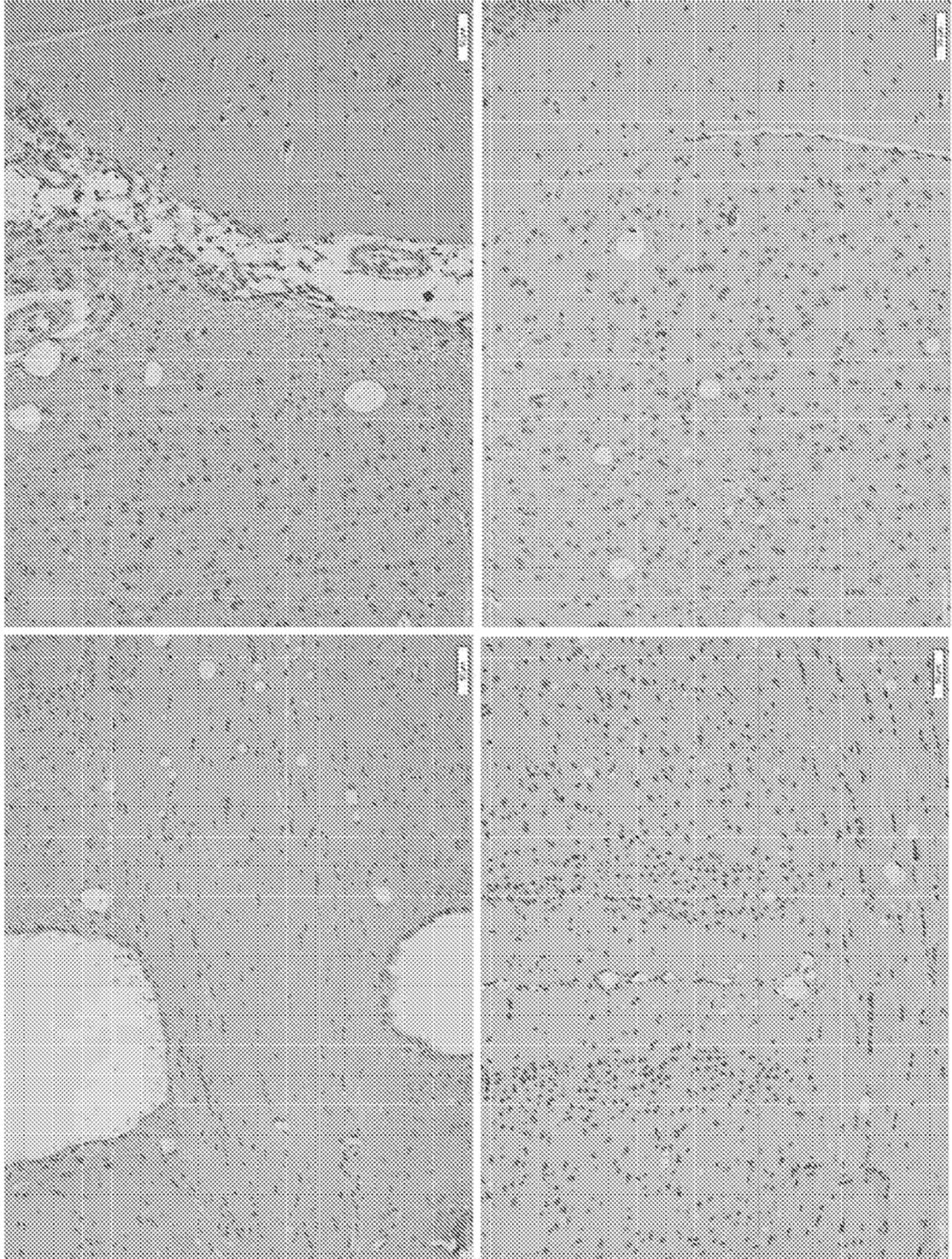


FIG. 7

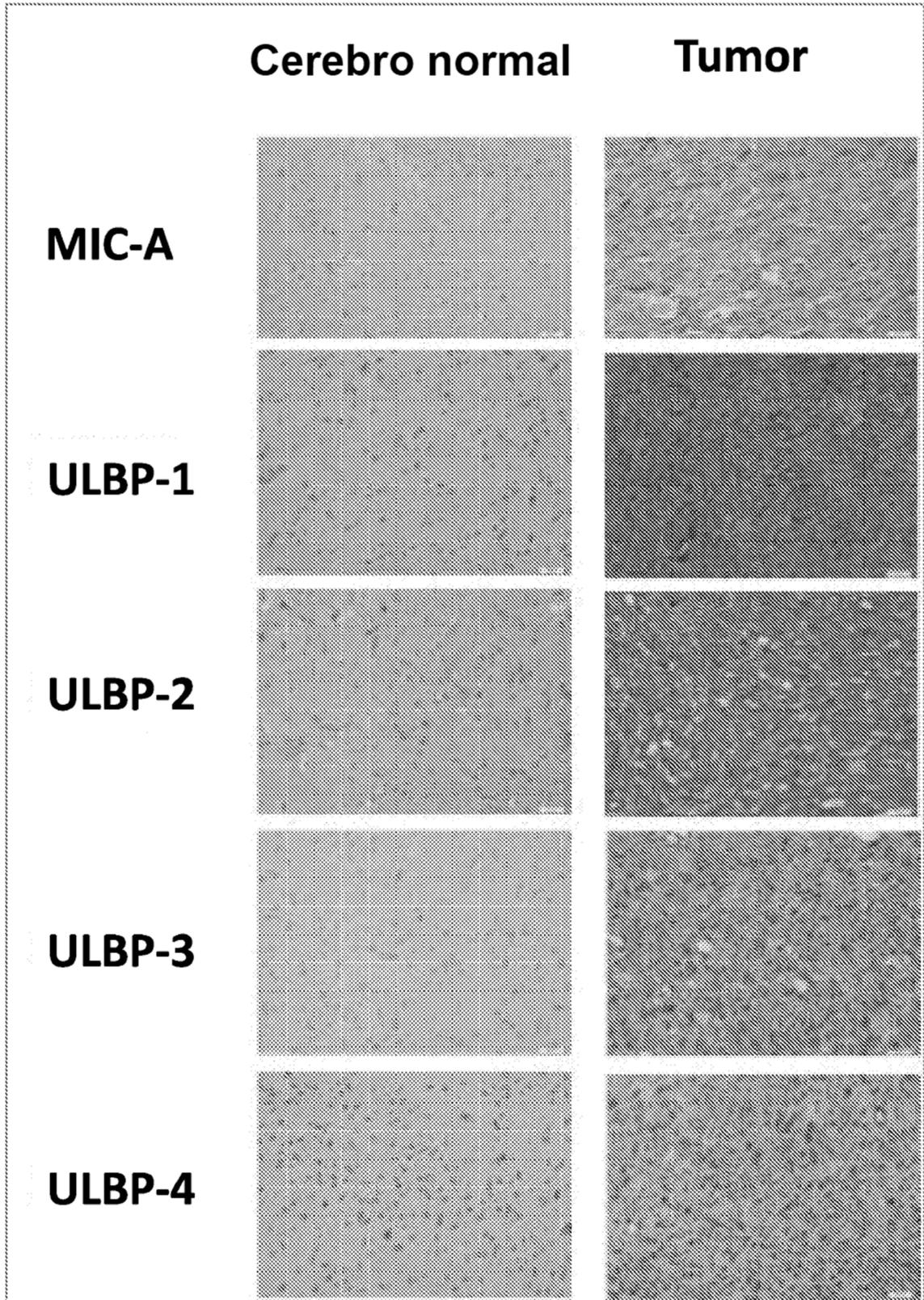


FIG. 8A

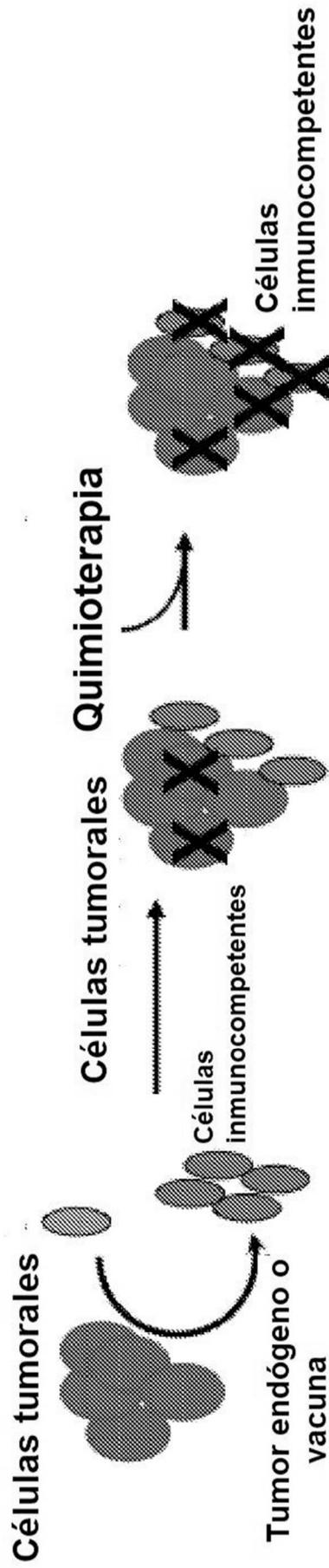
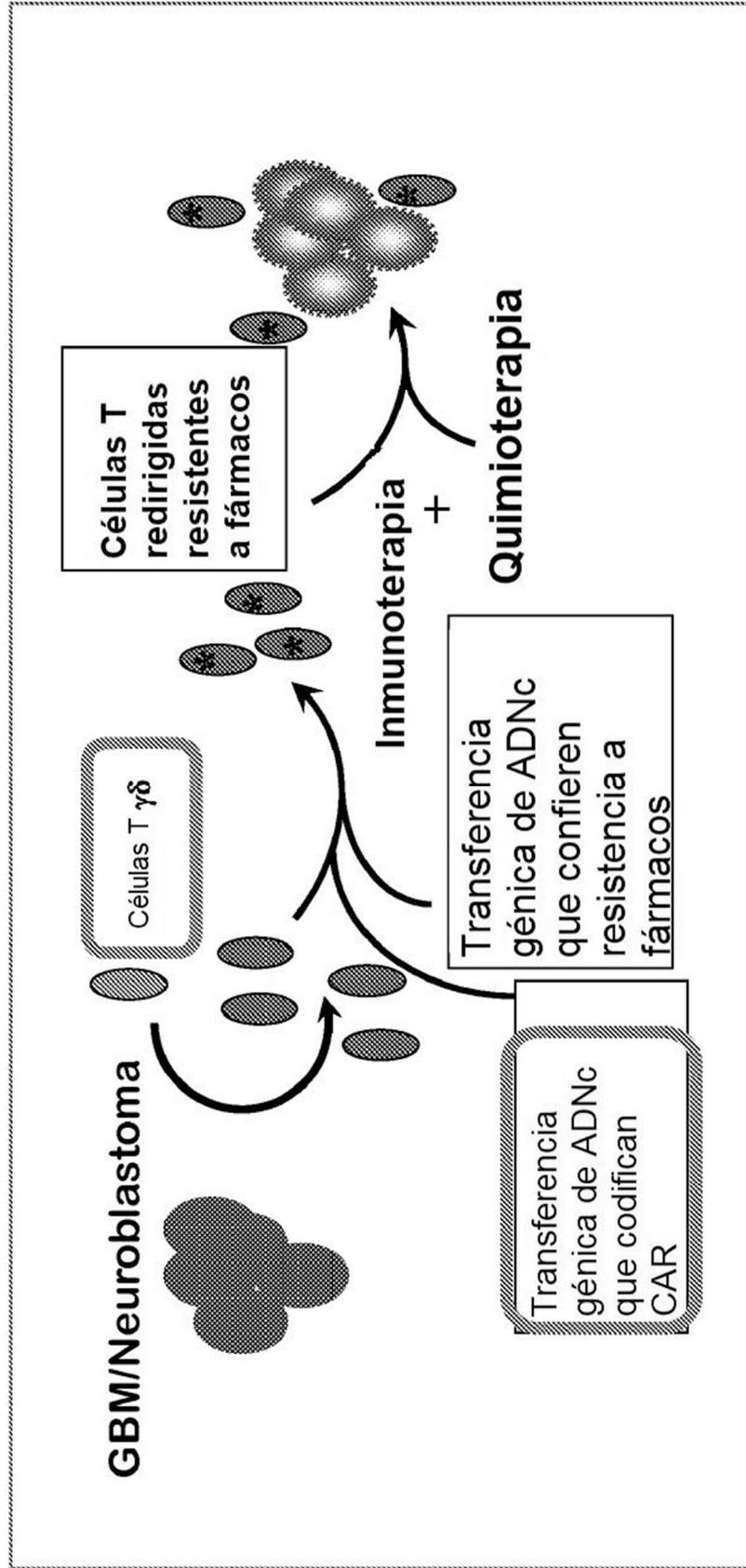


FIG. 8B



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- WO 2014164554 A1

**Literatura no patente citada en la descripción**

- **BRYANT NL ; SUAREZ-CUERVO C ; GILLESPIE GY ; MARKERT JM ; NABORS LB ; MELETH S ; LOPEZ RD ; LAMB LS, JR.** Characterization and immunotherapeutic potential of gammadelta T-cells in patients with glioblastoma. *Neuro Oncol.*, 2009, vol. 11 (4), 357-67
- **LAMB LS, JR.** gammadelta T cells as immune effectors against high-grade gliomas. *Immunol Res.*, 2009, vol. 45 (1), 85-95
- **BRYANT NL ; GILLESPIEGY ; LOPEZ RD ; MARKERT JM ; CLOUD GA ; LANGFORD CP ; ARNOUK H ; SU Y ; HAINES HL ; SUAREZ-CUERVO C.** Pre-clinical evaluation of ex vivo expanded/activated gammadelta T cells for immunotherapy of glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology*, 10 June 2010, vol. 101 (2), 179-88
- **LAMB LS, JR. ; BOWERSOCK J ; DASGUPTA A ; GILLESPIE GY ; SU Y ; JOHNSON A ; SPENCER HT.** Engineered drug resistant gammadelta T cells kill glioblastoma cell lines during a chemotherapy challenge: a strategy for combining chemo- and immunotherapy. *PLoS One.*, 18 January 2013, vol. 8 (1), e51805
- **BECK BH ; KIM HG ; KIM H ; SAMUEL S ; LIU Z ; SHRESTHA R ; HAINES H ; ZINN K ; LOPEZ RD.** Adoptively transferred ex vivo expanded gammadelta-T cells mediate in vivo antitumor activity in preclinical mouse models of breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 19 September 2009, vol. 122 (1), 135-44
- **ZHOU X ; DI STASI A ; TEY SK ; KRANCE RA ; MARTINEZ C ; LEUNG KS ; DURETT AG ; WU MF ; LIU H ; LEEN AM.** Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. *Blood*, 23 April 2014, vol. 123 (25), 3895-905 [0093]
- **DI STASI A ; TEY SK ; DOTTI G ; FUJITA Y ; KENNEDY-NASSER A ; MARTINEZ C ; STRAATHOF K ; LIU E ; DURETT AG ; GRILLEY B.** Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med.*, 04 November 2011, vol. 365 (18), 1673-83
- **ZITVOGEL L ; APETOH L ; GHIRINGHELLI F ; KROEMER G.** Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol.*, 2008, vol. 8 (1), 59-73
- **LAKE RA ; ROBINSON BW.** Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat Rev Cancer.*, 03 May 2005, vol. 5 (5), 397-405
- **VAN DER MOST RG ; ROBINSON BW ; LAKE RA.** Combining immunotherapy with chemotherapy to treat cancer. *Discov Med.*, 01 June 2005, vol. 5 (27), 265-70
- **RAMAKRISHNAN R ; ASSUDANI D ; NAGARAJ S ; HUNTER T ; CHO HI ; ANTONIA S ; ALTIOK S ; CELIS E ; GABRILOVICH DI.** Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *The Journal of clinical investigation*, 18 March 2010, vol. 120 (4), 1111-24
- **GULLEY JL ; MADAN RA ; ARLEN PM.** Enhancing efficacy of therapeutic vaccinations by combination with other modalities. *Vaccine*, 19 June 2007, vol. 25 (2), B89-96
- **FRIDLENDER ZG ; SUN J ; SINGHAL S ; KAPOOR V ; CHENG G ; SUZUKI E ; ALBELDA SM.** Chemotherapy delivered after viral immunogene therapy augments antitumor efficacy via multiple immune-mediated mechanisms. *Mol Ther.*, 05 August 2010, vol. 18 (11), 1947-59
- **ARLEN PM ; GULLEY JL ; PARKER C ; SKARUPA L ; PAZDUR M ; PANICALI D ; BEETHAM P ; TSANG KY ; GROSENBACH DW ; FELDMAN J.** A randomized phase II study of concurrent docetaxel plus vaccine versus vaccine alone in metastatic androgen-independent prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21 February 2006, vol. 12 (4), 1260-9
- **RAMAKRISHNAN R ; ANTONIA S ; GABRILOVICH DI.** Combined modality immunotherapy and chemotherapy: a new perspective. *Cancer Immunol Immunother.*, 20 May 2008, vol. 57 (10), 1523-9

- MITCHELL MS. Combinations of anticancer drugs and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.*, 28 August 2003, vol. 52 (11), 686-92
- ANTONIA SJ ; MIRZA N ; FRICKE I ; CHIAPPORI A ; THOMPSON P ; WILLIAMS N ; BEPLER G ; SIMON G ; JANSSEN W ; LEE JH. Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10 February 2006, vol. 12 (3 Pt 1), 878-87
- MERCHANT RE ; BALDWIN NG ; RICE CD ; BEAR HD. Adoptive immunotherapy of malignant glioma using tumor-sensitized T lymphocytes. *Neurol Res.*, 1997, vol. 19 (2), 145-52
- PLAUTZ GE ; BARNETT GH ; MILLER DW ; COHEN BH ; PRAYSON RA ; KRAUSS JC ; LUCIANO M ; KANGISSER DB ; SHU S. Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas. *J Neurosurg.*, 1998, vol. 89 (1), 42-51
- KRUSE CA ; CEPEDA L ; OWENS B ; JOHNSON SD ; STEARS J ; LILLEHEI KO. Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother.*, 1997, vol. 45 (2), 77-87
- READ SB ; KULPRATHIPANJA NV ; GOMEZ GG ; PAUL DB ; WINSTON KR ; ROBBINS JM ; KRUSE CA. Human alloreactive CTL interactions with gliomas and with those having upregulated HLA expression from exogenous IFN-gamma or IFN-gamma gene modification. *J Interferon Cytokine Res.*, 2003, vol. 23 (7), 379-93
- MERCHANT RE ; ELLISON MD ; YOUNG HF. Immunotherapy for malignant glioma using human recombinant interleukin-2 and activated autologous lymphocytes. A review of pre-clinical and clinical investigations. *J Neurooncol.*, 1990, vol. 8 (2), 173-88
- BARBA D ; SARIS SC ; HOLDER C ; ROSENBERG SA ; OLDFIELD EH. Intratumoral LAK cell and interleukin-2 therapy of human gliomas. *J Neurosurg.*, 1989, vol. 70 (2), 175-82
- SARIS SC ; PATRONAS NJ ; ROSENBERG SA ; ALEXANDER JT ; FRANK J ; SCHWARTZENTRUBER DJ ; RUBIN JT ; BARBA D ; OLDFIELD EH. The effect of intravenous interleukin-2 on brain water content. *J Neurosurg.*, 1989, vol. 71 (2), 169-74
- HAYES RL ; KOSLOW M ; HIESIGER EM ; HYMES KB ; HOCHSTER HS ; MOORE EJ ; PIERZ DM ; CHEN DK ; BUDZILOVICH GN ; RANSOHOFF J. Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma. *Cancer*, 1995, vol. 76 (5), 840-52
- DILLMAN RO ; DUMA CM ; SCHILTZ PM ; DEPRIEST C ; ELLIS RA ; OKAMOTO K ; BEUTEL LD ; DELEON C ; CHICO S. Intracavitary placement of autologous lymphokine-activated killer (LAK) cells after resection of recurrent glioblastoma. *J Immunother.*, 2004, vol. 27 (5), 398-404
- WU J ; GROH V ; SPIES T. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *J Immunol.*, 2002, vol. 169 (3), 1236-40
- POGGI A ; CAROSIO R ; FENOGLIO D ; BRENCI S ; MURDACA G ; SETTI M ; INDIVERI F ; SCABINI S ; FERRERO E ; ZOCCHI MR. Migration of V delta 1 and V delta 2 T cells in response to CXCR3 and CXCR4 ligands in healthy donors and HTV-1-infected patients: competition by HIV-1 Tat. *Blood*, 2004, vol. 103 (6), 2205-13
- KREBS S ; RODRÍGUEZ-CRUZ TG ; DERENZO C ; GOTTSCHALK S. Genetically modified T cells to target glioblastoma. *Front. Oncol.*, 2013, vol. 3, 322