

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 739**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 31/495 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2017** **E 20154049 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024** **EP 3673911**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para la inmunoterapia del cáncer**

30 Prioridad:

18.08.2016 US 201662376680 P

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

24.10.2024

73 Titular/es:

**THE UAB RESEARCH FOUNDATION (50.0%)
710 13th Street South CSB 120
Birmingham, AL 35233, US y
IN8BIO, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HO, WILLIAM y
LAMB, LAWRENCE S.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 983 739 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

Composiciones y procedimientos para la inmunoterapia del cáncer

Antecedentes de la invención

5 Aunque se han realizado progresos extraordinarios en los campos de la detección y terapias del cáncer, el tratamiento del cáncer en fase avanzada y metastásico sigue siendo un reto importante. Los agentes quimioterapéuticos citotóxicos siguen siendo uno de los tratamientos anticancerígenos más utilizados y empleados con éxito. Sin embargo, no son uniformemente eficaces, y la introducción de estos agentes con terapias novedosas, tal como las inmunoterapias, es problemática. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos pueden ser perjudiciales para el establecimiento de células inmunocompetentes antitumorales robustas debido a los perfiles de toxicidad no específicos de los agentes. Las terapias basadas en pequeñas moléculas dirigidas a las vías de proliferación celular también pueden dificultar el establecimiento de la inmunidad antitumoral. Otras complicaciones encontradas en los enfoques inmunoterapéuticos es la capacidad de las células tumorales para burlar la respuesta inmunitaria del organismo por medio de la regulación a la baja de la expresión de antígenos de clase I del CMH, la presentación de moléculas de control inmunitario en la superficie del tumor o de las células efectoras o la liberación de ligandos tumorales solubles en el plasma, lo que provoca la regulación a la baja de los receptores de las células efectoras. Tales procedimientos conducen a un tumor que parece normal, lo que resulta en la evasión de un ataque del sistema inmune. Sin embargo, si los regímenes de quimioterapia que son transitoriamente eficaces pueden combinarse tanto con nuevas terapias de células inmunocompetentes como con inhibidores de puntos de control inmunitario, entonces puede lograrse una mejora significativa en la terapia antineoplásica.

20 Se han identificado diversos genes resistentes a fármacos que pueden utilizarse potencialmente para conferir resistencia a los fármacos a las células diana inmunes, y los avances en las técnicas de terapia génica han permitido probar la viabilidad del uso de estos genes en estudios de terapia génica de resistencia a los fármacos. Por ejemplo, se utilizó una estrategia de ARNhc para disminuir los niveles de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT), que confiere resistencia a la 6-tioquina. Además, el gen MGMT resistente a los fármacos que codifica la alquil guanina transferasa humana (hAGT) es una proteína de reparación del ADN que confiere resistencia a los efectos citotóxicos de los agentes alquilantes, tal como las nitrosoureas y la temozolomida (TMZ). La 6-bencilguanina (6-BG) es un inhibidor de AGT que potencia la toxicidad de la nitrosourea y se coadministra con TMZ para potenciar los efectos citotóxicos de este agente. Varias formas mutantes de MGMT que codifican variantes de AGT son muy resistentes a la inactivación por 6-BG, pero conservan su capacidad de reparar daños en el ADN. Se ha demostrado que la terapia génica resistente a los fármacos basada en P140KMGMT confiere quimioprotección a las células de ratón, caninas, de macacos rhesus y humanas, específicamente a las células hematopoyéticas .

35 Las células tumorales suelen expresar moléculas de superficie celular que revelan su naturaleza cancerosa. Sin embargo, estas mismas células también pueden presentar en su superficie moléculas de control inmunitario que imitan a las de las células normales, evitando de este modo un ataque inmunitario. Los puntos de control inmunitarios suelen estar regulados por interacciones entre pares específicos de receptor/ligando, como CTLA-4 y PD-1. CTLA-4, PD-1 y sus ligandos son miembros de la familia CD28-B7 de moléculas de cosignalización que desempeñan papeles importantes en todas las fases de la función de las células T y otras funciones celulares. El receptor PD-1 se expresa en la superficie de los linfocitos T activados (y de los linfocitos B) y, en circunstancias normales, se une a sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas o los macrófagos. Esta interacción envía una señal a la célula T y esencialmente la apaga o inhibe. Las células cancerosas se aprovechan de este sistema impulsando altos niveles de expresión de PD-L1 en su superficie. Esto les permite obtener el control de la vía PD-1 y desactivar las células T que expresan PD-1 que puedan entrar en el microambiente tumoral, suprimiendo así la respuesta inmunitaria contra el cáncer.

45 Los inhibidores de puntos de control proporcionan un medio para desenmascarar las células tumorales por medio del bloqueo de pares receptor/ligando tal como CTLA-4 o PD-1, permitiendo que las células T monten una respuesta inmunitaria. Seis inhibidores de los puntos de control inmunitarios que han recibido la aprobación acelerada de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. para el cáncer son ipilimumab (YERVOY®), pembrolizumab (KEYTRUDA®), atezolizumab (TECENTRIQ®), durvalumab (IMFINZI™), avelumab (BAVENCIO) y nivolumab (OPDIVO®). YERVOY® es un anticuerpo monoclonal dirigido contra CTLA-4 en la superficie de las células T y está aprobado para el tratamiento del melanoma. KEYTRUDA® se dirige a PD-L1 y se utiliza para tratar el melanoma y el cáncer de pulmón no microcítico. OPDIVO® también se dirige a PD-1 y está aprobado para el tratamiento del melanoma, el carcinoma de células renales y el cáncer de pulmón no microcítico. Otras dianas de los puntos de control que pueden resultar eficaces son TIM-3, LAG-3, varios ligandos B-7, las quinasas CHK 1 y CHK2, BTLA, A2aR y otras.

55 Típicamente, la actividad y las altas tasas de respuesta objetiva (ORR) en relación con el tratamiento con inhibidores de puntos de control se asocian a tumores con altas cargas mutacionales. La frecuencia de las mutaciones suele estar correlacionada con una elevada señalización de neoantígenos, lo que se traduce en un aumento de la inmunogenicidad tumoral.

En mayo de 2017, la U.S. Food and Drug Administration (FDA) concedió la aprobación acelerada al pembrolizumab para pacientes adultos y pediátricos con tumores sólidos irsecables o metastásicos con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) o deficientes en la reparación de emparejamientos erróneos (dMMR) que hayan progresado tras un tratamiento previo y que no tengan opciones de tratamiento alternativas satisfactorias o con cáncer colorrectal MSI-H o dMMR que haya progresado tras un tratamiento con fluoropirimidina, oxaliplatino e irinotecán. Se trata de la primera aprobación de la FDA para una indicación agnóstica de tejido/sitio. Los pacientes con dMMR tienen un defecto que les confiere una incapacidad para corregir las mutaciones genéticas que conduce a un estado de hipermutación.

Los datos clínicos han demostrado que en cánceres tal como el colorrectal, en el que la ORR suele ser del 0% con el tratamiento con inhibidores de puntos de control, la ORR aumenta hasta el 62% en aquellos con dMMR debido a su elevada carga mutacional (Le DT, et al. ASCO 2015. Sumario LBA100). Del mismo modo, un análisis de Hodges et al. (Neuro-Oncology, 19(8), 1047-1057, 2017) demuestra que los glioblastomas (GBM) suelen tener una baja carga de mutaciones y que solo el 3,5 % de los GBM analizados presentan una alta carga mutacional tumoral. Sin embargo, en aquellos pacientes con GBM con dMMR, se ha encontrado que tienen la carga de mutación más alta sobre otros tumores de alto grado por Boufett et al. (JCO, 2016 34:19, 2206-2211). Boufett et al. describen las respuestas notables y duraderas de dos pacientes pediátricos con GBM multifocal recurrente que eran refractarios a las terapias estándar actuales cuando fueron tratados con nivolumab como agente único. Una mutación dMMR condujo a estos dos pacientes a respuestas con inhibición de puntos de control, pero sus respuestas fallidas a terapias estándar también pueden haberse debido a dMMR. Esto apoya los datos que sugieren que, en general, los GBM no son significativamente inmunogénicos y no es probable que demuestren ORR significativas cuando se tratan con inhibidores de puntos de control.

Desde 2005, el tratamiento estándar para el GBM de primera línea ha sido el Protocolo Stupp, que implica el tratamiento con la quimioterapia temozolomida (TMZ) (Stupp et al., N Engl J Med 2005; 352:987-996 10 de marzo de 2005). La TMZ es un agente alquilante que provoca roturas de ADN de doble cadena. La TMZ actúa creando aductos de O⁶-metilguanina (O⁶MeG) en el ADN que provocan una alteración y la formación de una mutación puntual de GC a AT (Roos et al., Cancer Letters 332 (2013) 237). El mecanismo de resistencia al tratamiento eficaz con TMZ es la O⁶-metilguanina-metiltransferasa (MGMT), que elimina el aducto de metilo de la posición O⁶. En las células que tienen un sistema MMR en funcionamiento, la mutación puntual de GC a AT provocará una rotura de doble cadena tras dos ciclos de replicación del ADN. Como señala Roos, "O⁶MeG no desencadena la apoptosis directamente; requiere MMR y replicación del ADN" Así, los pacientes con diagnóstico reciente de GBM que tienen más probabilidades de responder a la inmunoterapia y/o a la inhibición de puntos de control debido a su elevada carga mutacional y neoantígenos, son también los que tienen menos probabilidades de responder a las quimioterapias alquilantes convencionales. Esta constatación explicaría la observación de que las mutaciones MMR y MLH1 son en realidad un pronosticador negativo de la supervivencia en pacientes con GBM (Draaisma et al., Acta Neuropathol Commun. 2015, 3: 88). Estos pacientes no responden a la terapia convencional con TMZ.

La presente invención proporciona una solución a este reto. Mientras que las hipermutaciones debidas a dMMR pueden conducir a una señalización inmunogénica más fuerte, también es probable que den lugar a bajas respuestas a los agentes quimioterapéuticos estándar y a una baja supervivencia. Al provocar roturas de ADN de doble cadena, la TMZ ha demostrado su capacidad para provocar hipermutaciones en los tumores y reforzar la señalización inmunogénica. Por medio de la creación artificial de hipermutaciones con quimioterapia, se puede mantener la sensibilidad del tumor al tratamiento estándar y, al mismo tiempo, aumentar la inmunogenicidad del tumor y la capacidad de respuesta a la inhibición de los puntos de control si también se pueden mantener vivos los linfocitos durante el tratamiento con quimioterapia.

Desafortunadamente, con el tiempo es probable que las hipermutaciones impulsadas por TMZ causen mutaciones en el sistema MMR, lo que lleva a una menor sensibilidad a TMZ y otros agentes alquilantes. Sin ceñirnos a la teoría, lo más probable es que las hipermutaciones causadas por la TMZ u otros agentes alquilantes sean mutaciones subclonales de firma 11 que pueden no provocar inmunogenicidad a largo plazo (Alexandrov et al., Nature, Vol 500, 22 de agosto de 2013). Sin embargo, a más corto plazo, nuestros datos demuestran que el inicio de la rotura de doble cadena puede desencadenar una respuesta de daño del ADN que resulta en la regulación transitoria de los ligandos del receptor NKG2D en la superficie de la célula tumoral y desencadenar la activación de una respuesta inmune innata y la destrucción del tumor por las células T γδ resistentes a los fármacos (Lamb et al., PLOS ONE, Vol 8, Issue 1, Jan. 2013).

Así pues, la presente invención se dirige conjuntamente a ambos mecanismos en una fase temprana de la progresión del cáncer. Sin estar limitado por la teoría, el daño en el ADN causado por la TMZ provoca la regulación al alza de las proteínas quinasas relacionadas con la ataxia telangiectasia mutada (ATM) y la ataxia telangiectasia Rad-3 (ATR) asociadas a la respuesta al daño en el ADN. La respuesta al daño del ADN y la regulación al alza de ATM y ATR provocan la regulación al alza de ligandos NKG2D tales como MICA/B y ULBP16 en la superficie de las células tumorales y el inicio de una respuesta inmunitaria antitumoral. Al eliminar la mayor parte del tumor que es sensible a la quimioterapia y al mismo tiempo estimular la respuesta inmunitaria por medio de daños en el ADN y frenar las células inmunitarias con la inhibición de los puntos de control, tratamos de crear respuestas más potentes y duraderas para los pacientes con cáncer.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad urgente de procedimientos que potencien, sustituyan o complementen los procedimientos actuales de tratamiento de cánceres y, en particular, de aquellos que presentan respuestas transitorias a la quimioterapia. Las terapias combinadas que comprenden células inmunocompetentes resistentes a los fármacos, inhibidores de punto de control inmunitario y quimioterapia ofrecen un enfoque complementario de este tipo.

Puede encontrarse información pertinente sobre el estado de la técnica en:

- Lamb (2013); PlosOne 8(1):e51805
- Kamata (2016) Cancer Immunol. Immunother. 65:1477-1489
- Dondero (2016); Oncoimmunología
- Antonios (2017); Neuro-Oncología 19(6):796-807

Sumario de la invención

Los aspectos de la invención para los que se busca protección son como se definen en el pliego de reivindicaciones adjunto. La descripción puede contener información técnica adicional, que, aunque no forma parte de la invención reivindicada, se proporciona para situar la invención en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Las referencias en la presente memoria descriptiva a procedimientos de tratamiento del cuerpo humano o animal deben entenderse como referencias a medicamentos para su uso en un procedimiento de tratamiento.

La invención proporciona al menos un inhibidor de punto de control inmunitario para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer en un paciente que lo necesita, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- i. obtención de una población ampliada de células inmunitarias citotóxicas aisladas que comprenden células T $\gamma\delta$, en la que más del 50% aproximadamente de las células T $\gamma\delta$ han sido modificadas genéticamente para expresar un polipéptido que confiere resistencia a un agente quimioterapéutico;
- ii. administrar al paciente una cantidad eficaz del agente quimioterapéutico al que son resistentes las células inmunitarias citotóxicas modificadas genéticamente de la etapa (i);
- iii. administrar al paciente la población de células inmunitarias citotóxicas modificadas genéticamente de la etapa (i); y
- iv. administrar al paciente una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de punto de control inmunitario, en el que el inhibidor de punto de control se dirige a PD-1, PDL1 o CTLA-4.

La presente invención proporciona terapias combinadas para tratar el cáncer que comprenden composiciones y procedimientos para potenciar la respuesta inmunitaria de células inmunocompetentes contra el cáncer, incluida la protección frente a toxicidades inducidas por fármacos durante la quimioterapia, permitiendo de este modo la administración combinada de inmuno y quimioterapia, un tratamiento contra el cáncer denominado "inmunoterapia resistente a fármacos" en combinación con uno o más ciclos y/o dosis de un inhibidor de puntos de control inmunitario. La combinación de inhibidores de puntos de control e inmunoterapia farmacorresistente puede administrarse secuencialmente en cualquier orden, o sustancialmente de forma simultánea. La inmunoterapia farmacorresistente comprende la modificación genética de células inmunitarias citotóxicas aisladas. Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas aisladas se modifican genéticamente por medio de cualquier procedimiento conocido en la técnica. Preferentemente, el procedimiento de modificación genética incluye, entre otros, un sistema lentiviral basado en el VIH o un sistema de edición de genes. Preferentemente, el sistema de edición génica comprende el uso de endonucleasas dirigidas, incluyendo, pero sin limitarse a, nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALEN), o proteínas, como Cas9, asociadas a repeticiones palindrómicas agrupadas regularmente espaciadas (CRISPR) para administrar el elemento genético que confiere resistencia al fármaco en líneas celulares inmunocompetentes. Las células inmunocompetentes modificadas genéticamente desarrollaron una resistencia significativa a un agente citotóxico quimioterapéutico específico en comparación con las células no modificadas; sin embargo, la resistencia a los fármacos no afectó a la capacidad de las células genéticamente modificadas de eliminar las células cancerosas diana en presencia o ausencia de un agente quimioterapéutico. Dicha inmunoterapia resistente a fármacos se describe, por ejemplo, por Spencer H.T. et al. en el documento US 2015/0017137.

Se desvelan en la presente memoria descriptiva procedimientos para tratar el cáncer en un paciente, que comprenden las etapas de: obtener una población opcionalmente enriquecida y/u opcionalmente expandida de células inmunitarias citotóxicas, en la que las células inmunitarias citotóxicas comprenden células que han sido modificadas genéticamente para ser resistentes a un agente terapéutico; administrar a un paciente que lo necesita, una cantidad eficaz del agente terapéutico al que las células modificadas genéticamente son resistentes en combinación con la población de células

inmunitarias citotóxicas modificadas genéticamente, y administrar además al paciente una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de punto de control inmunitario, tratando de este modo el cáncer en el paciente.

La población de células inmunitarias citotóxicas utilizadas en las composiciones y procedimientos de la invención comprende células T $\gamma\delta$. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas comprende aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de células T $\gamma\delta$. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas comprende entre un 50% y un 95% de células T $\gamma\delta$. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas utilizadas en las composiciones y procedimientos de la invención comprende células T $\gamma\delta$ y células natural killer (NK). Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas comprende aproximadamente un 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o más de células NK. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas comprende entre un 5% y un 25% de células NK. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas utilizadas en las composiciones y procedimientos de la invención comprenden células T $\gamma\delta$, células NK y otras células inmunocompetentes que incluyen, pero no se limitan a: monocitos, dendritas y macrófagos. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas utilizadas en las composiciones y procedimientos de la invención comprenden células T $\gamma\delta$ derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC).

Preferentemente, la etapa de obtener una población de células inmunitarias citotóxicas modificadas genéticamente para ser resistentes a un agente terapéutico comprende: obtener de un individuo, tal como un individuo humano o animal, una población de células inmunitarias citotóxicas, por ejemplo, obteniendo una muestra biológica del individuo, incluida, entre otras, una muestra de sangre o de tejido, incluida una biopsia tumoral. Opcionalmente, la muestra puede enriquecerse en células inmunitarias citotóxicas y otras células inmunocompetentes y/o las células presentes en la muestra pueden expandirse para aumentar la población de las células presentes en la muestra. Las células inmunitarias citotóxicas son preferentemente establemente transformadas o editadas genéticamente con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga unida de forma operable a un promotor, en el que la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica un polipéptido que confiere a la célula resistencia al agente terapéutico.

En la presente memoria descriptiva se describen sistemas para tratar un cáncer en un paciente que comprenden un agente terapéutico citotóxico que tiene las características de inhibir la supervivencia de una célula cancerosa, una población de células inmunitarias citotóxicas que comprende células T $\gamma\delta$, células NK o cualquier combinación de las mismas y, opcionalmente, comprende además otras células inmunocompetentes y en las que las células inmunitarias citotóxicas están modificadas genéticamente para ser resistentes al agente terapéutico citotóxico, y un inhibidor de punto de control inmunitario que bloquea las proteínas de la superficie celular de las células cancerosas.

En la presente memoria descriptiva se describen sistemas para tratar un glioblastoma en un paciente que comprenden un agente terapéutico que tiene las características de inhibir la supervivencia de una célula cancerosa e inducir una proteína de estrés en la célula cancerosa, una población de células inmunitarias citotóxicas, en las que dichas células inmunitarias citotóxicas comprenden células T $\gamma\delta$, Células NK, o cualquier combinación de las mismas y, opcionalmente, otras células inmunocompetentes, y en las que dichas células inmunitarias citotóxicas han sido modificadas genéticamente para ser resistentes al agente terapéutico, en combinación con un inhibidor de punto de control inmunitario que bloquea las proteínas de la superficie celular de las células cancerosas.

La población de células inmunitarias citotóxicas utilizadas en la invención comprende células T $\gamma\delta$ en las que más del 50% aproximadamente, y preferentemente el 60%, 70% 80%, 90% o 95%, de las células T $\gamma\delta$ expresan un polipéptido que confiere resistencia a un agente quimioterapéutico. También se desvelan en la presente memoria descriptiva composiciones aisladas que comprenden células T $\gamma\delta$ en las que más del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células T $\gamma\delta$ comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere resistencia a un agente quimioterapéutico, o composiciones aisladas que consisten esencialmente en células T $\gamma\delta$ que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere resistencia a un agente quimioterapéutico. Preferentemente, el polipéptido que confiere resistencia a un agente quimioterapéutico es la O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT), una variante resistente a los fármacos de dihidrofolato reductasa (L22Y-DHFR), timidilato sintasa, proteína de resistencia a múltiples fármacos-1 (MDR1).

Se desvelan en la presente memoria descriptiva composiciones que comprenden al menos un inhibidor de punto de control, y una población aislada de células inmunitarias citotóxicas que comprenden células T $\gamma\delta$ células NK, o cualquier combinación de las mismas, en las que más de aproximadamente el 5%, y preferentemente más de aproximadamente el 50% de la población de células inmunitarias citotóxicas expresan un polipéptido que confiere resistencia a un agente terapéutico capaz de inhibir la supervivencia de una célula cancerosa.

Breve descripción de las figuras

Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos en los que como caracteres de referencia se refieren a las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de la invención.

La figura 1 Muestra la expresión de moléculas de punto de control en células T $\gamma\delta$, antes del cultivo *in vitro* de PBMC del donante 1.

La figura 2 Muestra la regulación al alza de las moléculas de punto de control en células T $\gamma\delta$ enriquecidas *in vitro* del donante 1.

5 La figura 3 Muestra la expresión de moléculas de punto de control en células T $\gamma\delta$, antes del cultivo *in vitro* de PBMC del donante 2.

La figura 4 Muestra la regulación al alza de las moléculas de punto de control en células T $\gamma\delta$ enriquecidas *in vitro* del donante 2.

10 La figura 5 Muestra la regulación al alza de PD-1 y CTLA-4 en células T $\gamma\delta$ humanas tras la estimulación con IL2 y Zol.

La figura 6 Muestra la expresión de PD-L1 en células tumorales de glioblastoma.

La figura 7 Muestra la citotoxicidad de las células $\gamma\delta$ T fabricadas con GMP.

Descripción detallada

15 La presente invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que éstas pueden, por supuesto, variar. Se deberá entender, además, que la terminología que se usa en la presente memoria es para el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el ámbito de la presente invención se limitará solamente por las reivindicaciones anexas.

20 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor interviniente, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior (a menos que el contexto dicte claramente lo contrario), entre el límite superior y el inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor declarado o interviniente en ese intervalo declarado, está incluido en la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden incluirse de forma independiente en los intervalos más pequeños y también se engloban dentro de la divulgación, sin perjuicio de cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Donde el intervalo indicado incluya uno o los dos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos límites incluidos se incluyen también en la invención.

25 A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por aquellos con experiencia en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o prueba de la presente divulgación, también se puede usar cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria, ahora se describen los procedimientos y materiales preferentes.

30 A menos que se indique lo contrario, la presente especificación describe técnicas de química, química orgánica sintética, bioquímica, biología, biología molecular, imagen molecular y similares, que están dentro de las habilidades de la técnica. Tales técnicas se explican totalmente en la bibliografía.

35 Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa de cómo realizar los procedimientos y utilizar las composiciones y los compuestos que se describen y reivindican en la presente memoria.

40 A menos que se indique lo contrario, la presente invención no se limita a materiales, reactivos, materiales de reacción, procedimientos de fabricación o similares particulares, ya que éstos pueden variar. También debe comprenderse que la terminología empleada en la presente memoria tiene por objeto describir únicamente determinadas realizaciones y no pretende ser limitativa. También es posible en la presente invención que las etapas se ejecuten en una secuencia diferente cuando esto sea lógicamente posible.

45 Cabe señalar que, tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno, una" y "el/la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un soporte" incluye una pluralidad de soportes. En esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a un número de términos que se definirán con el siguiente significado, a menos que sea evidente una intención contraria.

Definiciones

Al describir y reivindicar el tópico desvelado, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones establecidas a continuación.

50 Por "administración" se entiende la introducción de un compuesto, materiales biológicos que incluyen una población celular, o una de sus combinaciones, de la presente divulgación en un individuo humano o animal. Una vía de administración preferente de los compuestos es la intravenosa. Otras vías preferentes de administración de los compuestos pueden ser intraperitoneal o intrapleural, o a través de un catéter hasta el cerebro. Sin embargo, puede utilizarse cualquier vía de administración, tal como oral, tópica, subcutánea, peritoneal, intraarterial, inhalación, vaginal, rectal, nasal, introducción en el líquido cefalorraquídeo o instilación en compartimentos corporales. También se contempla la inyección directa en un sitio de tejido diana, tal como un tumor sólido.

Los términos "agente terapéutico", "agente quimioterapéutico" o "fármaco", tal y como se utilizan en la presente memoria descriptiva, se refieren a un compuesto o a uno de sus derivados que puede interactuar con una célula cancerosa, reduciendo de este modo el estado proliferativo de la célula y/o matándola. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes quimioterapéuticos que incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida); antagonistas metabólicos (por ejemplo, metotrexato (MTX), 5-fluorouracilo o sus derivados); un nucleótido sustituido; un nucleósido sustituido; agentes desmetilantes del ADN (también conocidos como antimetabolitos; p. ej., azacitidina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, mitomicina, adriamicina); agentes antitumorales derivados de plantas (por ejemplo, vincristina, vindesina, TAXOL®, paclitaxel, abraxano); cisplatino; carboplatino; etopósido; y similares. Tales agentes pueden incluir, además, pero sin limitación, los agentes anticancerígenos trimetotexato (TMTX), temozolomida, raltitrexed, S-(4-Nitrobencil)-6-tioinosina (NBMPR), 6-bencilguanidina (6-BG), nitrosoureas [por ejemplo, bis-cloronitrosourea (BCNU; carmustina), lomustina (CCNU) +/- Procarbacin y Vincristina (PCV régimen) fotomustina]; citarabina y camptotecina, o un derivado terapéutico de cualquiera de estos.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la cantidad del compuesto que se administra que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de una enfermedad, una condición o un trastorno que se está tratando. En referencia al cáncer o a las patologías relacionadas con la división celular no regulada, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad que tiene el efecto de (1) reducir el tamaño de un tumor, (2) inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto, preferentemente detener) la división celular aberrante, por ejemplo la división de las células cancerosas, (3) prevenir o reducir la metástasis de las células cancerosas, y/o, (4) aliviar hasta cierto punto (o, preferentemente, eliminar) uno o más síntomas asociados a una patología relacionada o causada en parte por la división celular no regulada o aberrante, incluyendo, por ejemplo, el cáncer, o la angiogénesis.

Los términos "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad (o una afección o un trastorno), tal y como se utilizan en la presente memoria, se refieren a la prevención de la enfermedad en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no experimenta o muestra síntomas de la misma (tratamiento profiláctico), a la inhibición de la enfermedad (ralentizando o deteniendo su desarrollo), al alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo el tratamiento paliativo), y al alivio de la enfermedad (causando la regresión de la enfermedad). En lo que respecta al cáncer, estos términos también significan que la esperanza de vida de un individuo afectado por un cáncer puede aumentar o que uno o varios de los síntomas de la enfermedad se reducirán. Con respecto al cáncer, "tratar" también incluye potenciar o prolongar una respuesta antitumoral en un individuo.

Tal como se utiliza aquí, cualquier forma de administración de una "combinación", "terapia combinada" y/o "régimen de tratamiento combinado" se refiere a al menos dos fármacos o composiciones terapéuticamente activos que pueden administrarse simultáneamente, en formulaciones separadas o combinadas, o secuencialmente en momentos diferentes separados por minutos, horas o días, pero que de alguna manera actúan juntos para proporcionar la respuesta terapéutica deseada.

El término "potenciar", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a permitir que un individuo o célula tumoral mejore su capacidad de responder a un tratamiento divulgado en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, una respuesta mejorada puede comprender un aumento de la capacidad de respuesta de al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% o más. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "potenciar" también puede referirse a potenciar el número de individuos que responden a un tratamiento como una terapia combinada que comprende quimioterapia, células inmunocompetentes resistentes a fármacos e inhibidores de puntos de control inmunitarios. Por ejemplo, una respuesta mejorada puede referirse a un porcentaje total de individuos que responden a un tratamiento en el que el porcentaje es de al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% o más.

Los términos "individuo" y "paciente", tal y como se utilizan en la presente memoria descriptiva, incluyen a los seres humanos, los mamíferos (por ejemplo, gatos, perros, caballos, etc.), células vivas, y otros organismos vivos. Un organismo vivo puede ser tan simple como, por ejemplo, una sola célula eucariota o tan complejo como un mamífero. Los pacientes típicos son los mamíferos, en particular los primates, sobre todo los humanos. Para las aplicaciones veterinarias, será adecuada una amplia variedad de individuos, *por ejemplo*, ganado tal como vacuno, ovejas, cabras, vacas, cerdos y similares; aves de corral tal como pollos, patos, gansos, pavos y similares; y animales domésticos, en particular mascotas tal como perros y gatos. Para aplicaciones de diagnóstico o de investigación, una amplia variedad de mamíferos serán individuos adecuados, incluyendo roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsters), conejos, primates y cerdos, tal como cerdos endogámicos y similares. Preferentemente, un sistema incluye una muestra y un individuo. El término "huésped vivo" se refiere a los huéspedes u organismos mencionados anteriormente que están vivos y no están muertos. El término "huésped vivo" se refiere a todo el huésped u organismo y no sólo a una parte extirpada (por ejemplo, un hígado u otro órgano) del huésped vivo.

El término "células T $\gamma\delta$ (células T gamma delta)", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un pequeño subconjunto de células T que pueden unirse específicamente a un receptor de células T (TCR) distinto en su superficie. La mayoría de las células T tienen un TCR compuesto por dos cadenas de glicoproteínas llamadas cadenas α - y β -TCR. En cambio, en las células T $\gamma\delta$, el TCR está formado por una cadena γ y una cadena δ . Este

grupo de células T suele ser mucho menos común que las células T $\alpha\beta$, pero se encuentran en su mayor abundancia en la mucosa intestinal, dentro de una población de linfocitos conocida como linfocitos intraepiteliales (IEL). Las moléculas antigénicas que activan las células T $\gamma\delta$ son todavía muy desconocidas. Sin embargo, las células T $\gamma\delta$ son peculiares en el sentido de que no parecen requerir el procesamiento del antígeno y la presentación del MHC de los epítomos peptídicos, aunque algunas reconocen las moléculas MHC de clase IB. Además, se presume que las células T $\gamma\delta$ tienen un papel destacado en el reconocimiento de los antígenos lipídicos, y que responden a los antígenos relacionados con el estrés, tal como MIC-A y MIC-B.

El término "células madre pluripotentes inducidas humanas" (hiPSC), tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un tipo de células madre pluripotentes que pueden generarse directamente a partir de células humanas adultas, tal como células de la piel o de la sangre, que han sido reprogramadas de nuevo a un estado pluripotente similar al embrionario que permite la generación de cualquier otro tipo de célula humana, por ejemplo, una célula inmunocompetente terapéutica. Las células adultas humanas a partir de las cuales se obtienen las hiPSC pueden obtenerse del paciente que va a ser tratado o pueden obtenerse de un individuo diferente. Las células adultas humanas pueden transformarse en células madre pluripotentes con, por ejemplo, un sistema retroviral o un sistema lentiviral para introducir genes que codifiquen factores de transcripción capaces de convertir células adultas en células madre pluripotentes.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza aquí, se refiere a una inmunoglobulina o a una parte de la misma, y abarca cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión a antígeno, independientemente de la fuente, la especie de origen, el procedimiento de producción y las características. Los anticuerpos pueden estar compuestos por cadenas pesadas y/o ligeras o fragmentos de las mismas. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos de cadena simple, fragmentos de unión a epítomo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs de cadena única (scFv), anticuerpos de cadena única, Fvs ligados a disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id). Las moléculas ScFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en U.S. Pat. No. 5,892,019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

El término "terapéutico biológico" o "biofarmacéutico", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a cualquier producto medicinal fabricado o extraído de fuentes biológicas. Los productos biofarmacéuticos son distintos de los productos farmacéuticos de síntesis química. Algunos ejemplos de biofármacos son las vacunas, la sangre o sus componentes, los alérgenos, las células somáticas, las terapias génicas, los tejidos, las proteínas terapéuticas recombinantes, incluidas las terapias con anticuerpos y las proteínas de fusión, y las células vivas. Los productos biológicos pueden estar compuestos de azúcares, proteínas o ácidos nucleicos, o de combinaciones complejas de estas sustancias, o pueden ser entidades vivas tal como células y tejidos. Los productos biológicos se aíslan de diversas fuentes naturales humanas, animales o microorganismos y pueden producirse por medio de procedimientos biotecnológicos y otras tecnologías. Ejemplos específicos de terapias biológicas incluyen, entre otros, agentes inmunoestimulantes, factores de crecimiento de células T, interleucinas, anticuerpos, proteínas de fusión y vacunas, tal como las vacunas contra el cáncer.

El término "cáncer", tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, tendrá su significado ordinario, como término general para las enfermedades en las que las células anormales se dividen sin control. En particular, y en el contexto de las realizaciones de la presente invención, el cáncer se refiere al cáncer relacionado con la angiogénesis. Las células cancerosas pueden invadir los tejidos cercanos y propagarse a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Hay varios tipos principales de cáncer, por ejemplo, el carcinoma es un cáncer que comienza en la piel o en los tejidos que revisten o recubren los órganos internos. El sarcoma es un cáncer que comienza en los huesos, cartílagos, grasas, músculos, vasos sanguíneos u otro tejido conectivo o de soporte. La leucemia es un cáncer que se inicia en el tejido hematopoyético, tal como la médula ósea, y provoca la producción de un gran número de células sanguíneas anormales que entran en el torrente sanguíneo. El linfoma es un cáncer que comienza en las células del sistema inmunitario.

Cuando las células normales pierden su capacidad de comportarse como una unidad específica, controlada y coordinada, se forma un tumor. Por lo general, un tumor sólido es una masa anormal de tejido que no suele contener quistes ni áreas líquidas (algunos tumores cerebrales sí tienen quistes y áreas necróticas centrales llenas de líquido). Un mismo tumor puede incluso tener diferentes poblaciones de células en su interior, con diferentes procesos que se han estropeado. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben el nombre del tipo de células que los forman. Algunos ejemplos de tumores sólidos son sarcomas, carcinomas y linfomas. Las leucemias (cánceres de la sangre) no suelen formar tumores sólidos.

Los cánceres representativos incluyen, pero no se limitan a, Leucemia Linfoblástica Aguda, Adulto; Leucemia Linfoblástica Aguda, Infantil; Leucemia Mieloide Aguda, Adulto; Carcinoma Adrenocortical; Carcinoma Adrenocortical, Infantil; Linfoma Relacionado con el SIDA; Neoplasias Malignas Relacionadas con el SIDA; Cáncer Anal; Astrocitoma Cerebeloso Infantil; Astrocitoma Cerebral Infantil; Cáncer de Vías Biliares, Extrahepático; Cáncer de Vejiga; Cáncer de Vejiga, Infantil; Cáncer Óseo, Osteosarcoma/Histiocitoma Fibroso Maligno; Glioblastoma, Infantil; Glioblastoma,

Adulto; Glioma de Tallo Cerebral, Infantil; Tumor Cerebral, Adulto; Tumor Cerebral, Glioma de Tallo Cerebral, Infantil; Tumor Cerebral, Astrocitoma Cerebeloso, Infantil; Tumor Cerebral, Astrocitoma Cerebral/Glioma Maligno, Infantil; Tumor Cerebral, Ependimoma, Infantil; Tumor Cerebral, Meduloblastoma, Infantil; Tumor Cerebral, Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Supratentoriales, Infantil; Tumor Cerebral, Glioma de la Vía Visual e Hipotalámico, Infantil; Tumor Cerebral, Infantil (Otros); Cáncer de Mama; Cáncer de Mama y Embarazo; Cáncer de Mama, Infantil; Cáncer de Mama, Masculino; Adenomas/Carcinoides Bronquiales, Infantil; Tumor carcinoide infantil; Tumor carcinoide gastrointestinal; Carcinoma adrenocortical; Carcinoma de células de los islotes; Carcinoma de tumor primario desconocido; Linfoma primario del sistema nervioso central; Astrocitoma cerebeloso infantil; Astrocitoma cerebral/glioma maligno infantil; Cáncer de cuello uterino; Cánceres infantiles; Leucemia linfocítica crónica; Leucemia mielógena crónica; Trastornos mieloproliferativos crónicos; Sarcoma de células claras de vainas tendinosas; Cáncer de colon; Cáncer colorrectal infantil; Linfoma cutáneo de células T; Cáncer de endometrio; Ependimoma infantil; Cáncer epitelial de ovario; Cáncer de esófago; Cáncer de esófago infantil; Tumores de la familia de Ewing; Tumor extracraneal de células germinales infantil; Tumor extragonadal de células germinales; Cáncer de vías biliares extrahepáticas; Cáncer ocular, melanoma intraocular; Cáncer de ojo, retinoblastoma; Cáncer de vesícula biliar; Cáncer gástrico (de estómago); Cáncer gástrico (de estómago), infantil; Tumor carcinoide gastrointestinal; Tumor extracraneal de células germinales, infantil; Tumor extragonadal de células germinales; Tumor ovárico de células germinales; Tumor trofoblástico gestacional; Glioma. Tallo cerebral infantil; Glioma. Vía visual infantil e hipotalámico; leucemia de células vellosas; cáncer de cabeza y cuello; cáncer hepatocelular (hígado), adulto (primario); cáncer hepatocelular (hígado), infantil (primario); linfoma de Hodgkin, adulto; linfoma de Hodgkin, infantil; linfoma de Hodgkin durante el embarazo; cáncer de hipofaringe; glioma de vía hipotalámica y visual, infantil; melanoma intraocular; carcinoma de células de islotes (páncreas endocrino); sarcoma de Kaposi; cáncer de riñón; cáncer de laringe; cáncer de laringe, infantil; leucemia, linfoblástica aguda, adultos; leucemia, linfoblástica aguda, infantil; leucemia, mieloide aguda, adultos; leucemia, mieloide aguda, infantil; leucemia, linfocítica crónica; leucemia, mieloide crónica; leucemia, células vellosas; cáncer de labio y cavidad oral; cáncer de hígado, adulto (primario); cáncer de hígado, infantil (primario); cáncer de pulmón, células no pequeñas; cáncer de pulmón, células pequeñas; leucemia linfoblástica, aguda adulta; leucemia linfoblástica, aguda infantil; leucemia linfocítica, crónica; linfoma, relacionado con el SIDA; linfoma, sistema nervioso central (primario); linfoma, células T cutáneas; linfoma, Hodgkin, adulto; linfoma, Hodgkin, infantil; linfoma, Hodgkin, durante el embarazo; linfoma, no Hodgkin, adulto; linfoma, no Hodgkin, infantil; linfoma no Hodgkin, durante el embarazo; linfoma, sistema nervioso central primario; macroglobulinemia, Waldenstrom; cáncer de mama masculino; mesotelioma maligno, adulto; mesotelioma maligno, infantil; timoma maligno; meduloblastoma, infantil; melanoma; melanoma, intraocular; carcinoma de células de Merkel; mesotelioma, maligno; cáncer escamoso de cuello metastásico con primario oculto; síndrome de neoplasia endocrina múltiple, infantil; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoide; síndromes mielodisplásicos; leucemia mielógena, crónica; leucemia mieloide, aguda infantil; mieloma múltiple; trastornos mieloproliferativos, crónicos; cáncer de cavidad nasal y seno paranasal; cáncer nasofaríngeo; cáncer nasofaríngeo, infantil; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin, adulto; linfoma no Hodgkin, infantil; linfoma no Hodgkin durante el embarazo; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer oral, infantil; cavidad oral y cáncer de labio; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso; cáncer de ovario, infantil; cáncer epitelial de ovario; tumor de células germinales de ovario; tumor de ovario con bajo potencial maligno; cáncer de páncreas; cáncer de páncreas, infantil; cáncer de páncreas, células de islotes; cáncer de seno paranasal y de cavidad nasal; cáncer de paratiroides; cáncer de pene; feocromocitoma; tumores neuroectodérmicos primitivos pineales y supratentoriales, infantil; tumor pituitario; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple; blastoma pleuropulmonar; embarazo y cáncer de mama; embarazo y linfoma de Hodgkin; embarazo y linfoma no Hodgkin; linfoma primario del sistema nervioso central; cáncer primario de hígado, adulto; cáncer primario de hígado, infantil; cáncer de próstata; cáncer de recto; cáncer de células renales (riñón); cáncer de células renales, infantil; pelvis renal y uréter, cáncer de células transicionales; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma, infantil; cáncer de glándulas salivales; cáncer de glándulas salivales, infantil; sarcoma, familia de tumores de Ewing; sarcoma de Kaposi; sarcoma (osteosarcoma)/histiocitoma fibroso maligno de hueso; sarcoma, rhabdomyosarcoma, infantil; sarcoma, tejido blando, adulto; sarcoma, tejido blando, infantil; síndrome de Sezary; cáncer de piel; cáncer de piel, infantil; cáncer de piel (melanoma); carcinoma de piel, células de Merkel; cáncer de pulmón de células pequeñas; cáncer de intestino delgado; sarcoma de tejido blando, adulto; sarcoma de tejido blando, infantil; cáncer escamoso de cuello con oculto primario, metastásico; cáncer de estómago (gástrico); cáncer de estómago (gástrico), infantil; tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, infantil; linfoma de células T, cutáneo; cáncer testicular; timoma, infantil; timoma, maligno; cáncer de tiroides; cáncer de tiroides, infantil; cáncer de células transicionales de la pelvis renal y uréter; tumor trofoblástico, gestacional; sitio primario desconocido, cáncer de, infantil; cánceres inusuales de la infancia; uréter y pelvis renal, cáncer de células transicionales; cáncer de uretra; sarcoma uterino; cáncer vaginal; vía visual y glioma hipotalámico, infantil; cáncer de vulva; macroglobulinemia de Waldenstrom; y tumor de Wilms, entre otros.

Un tumor puede clasificarse como maligno o benigno. En ambos casos, se produce una agregación y proliferación anormal de células. En el caso de un tumor maligno, estas células se comportan de forma más agresiva, adquiriendo propiedades de mayor invasión. En última instancia, las células tumorales pueden incluso adquirir la capacidad de desprenderse del entorno microscópico en el que se originaron, extenderse a otra área del cuerpo (con un entorno muy diferente, que normalmente no favorece su crecimiento) y continuar su rápido crecimiento y división en esta nueva ubicación. Esto se llama metástasis. Una vez que las células malignas han hecho metástasis, conseguir una cura es más difícil. Los tumores benignos tienen menos tendencia a invadir y son menos propensos a hacer metástasis.

Los tumores cerebrales se extienden ampliamente dentro del cerebro, pero no suelen hacer metástasis fuera de éste. Los gliomas son muy invasivos dentro del cerebro, incluso atravesando los hemisferios. Sin embargo, se dividen de forma incontrolada. Dependiendo de su localización, pueden ser tan peligrosos para la vida como las lesiones malignas. Un ejemplo de esto sería un tumor benigno en el cerebro, que puede crecer y ocupar espacio dentro del cráneo, provocando un aumento de la presión en el cerebro.

El término "enriquecido", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere al aumento del porcentaje total de uno o más tipos de células inmunitarias citotóxicas presentes (por ejemplo, células T $\gamma\delta$ y/o células NK) en una muestra, en relación con el porcentaje total del mismo uno o más tipos de células antes del enriquecimiento, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, una muestra "enriquecida" para uno o más tipos de células inmunitarias citotóxicas puede comprender entre aproximadamente el 10% y el 100% de uno o más tipos de células inmunitarias citotóxicas en la muestra, mientras que el porcentaje total de uno o más tipos de células inmunitarias citotóxicas en una muestra antes del enriquecimiento estaba, por ejemplo, entre el 0% y el 10%. Preferentemente, una muestra enriquecida comprende al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%, de uno o más tipos de células inmunitarias citotóxicas. Las muestras pueden enriquecerse para uno o más tipos celulares mediante el uso de técnicas estándar, por ejemplo, técnicas de citometría de flujo.

El término "altamente enriquecido", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere al aumento del porcentaje total de uno o más tipos de células inmunitarias citotóxicas en una muestra de forma que uno o más tipos de células inmunitarias citotóxicas pueden comprender entre al menos aproximadamente el 70% y aproximadamente el 100% del tipo de célula inmunitaria citotóxica en la muestra, mientras que el porcentaje total de ese mismo tipo de célula inmunitaria citotóxica antes del enriquecimiento estaba, por ejemplo, entre el 0% y el 10%. Preferentemente, una muestra altamente enriquecida comprende al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más de uno o más tipos de células inmunitarias citotóxicas. Las muestras pueden ser altamente enriquecidas para uno o más tipos celulares mediante el uso de técnicas estándar, por ejemplo, técnicas de citometría de flujo.

Los términos "expandido" y "expansión", tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva con respecto a la expansión de una o más células inmunitarias citotóxicas en una muestra, significan aumentar el número de una o más células inmunitarias citotóxicas en una muestra, por ejemplo, en al menos 2 veces, preferentemente en al menos 5 veces, preferentemente en al menos 10 veces, preferentemente en al menos 50 veces o más. La expansión de una población de células inmunitarias citotóxicas puede lograrse por cualquier número de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células T pueden expandirse rápidamente mediante el uso de la estimulación de receptores de células T inespecíficos en presencia de linfocitos alimentadores e interleucina-2 (IL-2) o interleucina-15 (IL-15), siendo preferente la IL-2. El estímulo no específico del receptor de células T puede incluir aproximadamente 30 ng/ml de OKT3, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 (disponible en ORTHO-MCNEIL®, Raritan, N.J.). Como alternativa, las células T pueden expandirse rápidamente por medio de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) *in vitro* con uno o más antígenos (incluidas porciones antigénicas de los mismos, tal como epítipo(s), o una célula) del cáncer, que pueden expresarse opcionalmente a partir de un vector, tal como un péptido de unión al antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), por ejemplo, 0.3 μ M MART-1:26-35 (27 L) o gp100:209-217 (210M), en presencia de un factor de crecimiento de células T, tal como 300 UI/ml de IL-2 o IL-15, siendo preferente la IL-2.

El término "proteína de fusión", tal como se utiliza aquí, se refiere a moléculas quiméricas, que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión a diana, y al menos una porción heteróloga, es decir, una porción con la que no está naturalmente unida en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se juntan en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína, pero se colocan en una nueva disposición en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión pueden crearse, por ejemplo, por medio de síntesis química, o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones peptídicas estén codificadas en la relación deseada.

El término "reducción de un cáncer", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una reducción del tamaño o del volumen de una masa tumoral, a una disminución del número de tumores con metástasis en un individuo, a una disminución del estado proliferativo (el grado de multiplicación de las células cancerosas) de las células cancerosas, y similares.

Los términos "aislado" y "población aislada de células", tal y como se utilizan en la presente memoria, se refieren a una célula o a una pluralidad de células extraídas del tejido o del estado en el que se encuentran en un individuo. Los términos pueden incluir además células que han sido separadas de acuerdo con parámetros tales como, pero no limitados a, marcadores de la superficie celular, un marcador reportero tal como un tinte o etiqueta,

El término "expresado" o "expresión", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la transcripción de un gen para dar una molécula de ácido nucleico de ARN al menos complementaria en parte a una región de una de las dos cadenas de ácido nucleico del gen. El término "expresado" o "expresión", tal y como se utiliza en la presente memoria, también se refiere a la traducción de dicha molécula de ácido nucleico de ARN para dar una proteína, un polipéptido o una de sus porciones o fragmentos.

El término "promotor", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la secuencia de ADN que determina el sitio de inicio de la transcripción de una ARN polimerasa. Un "elemento promotor-proximal" puede ser una secuencia reguladora dentro de aproximadamente 200 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción.

El término "célula recombinante" se refiere a una célula que tiene una nueva combinación de segmentos de ácido nucleico que no están unidos covalentemente entre sí en la naturaleza. Una nueva combinación de segmentos de ácido nucleico puede introducirse en un organismo utilizando una amplia gama de técnicas de manipulación de ácidos nucleicos disponibles para los expertos en la técnica. Una célula recombinante puede ser una única célula eucariota, o una única célula procariota, o una célula de mamífero. La célula recombinante puede albergar un vector que es extragenómico. Un vector de ácido nucleico extragenómico no se inserta en el genoma de la célula. Una célula recombinante puede albergar además un vector o una porción del mismo que sea intragenómico. El término "intragenómico" define una construcción de ácido nucleico incorporada dentro del genoma de la célula recombinante.

Los términos "ácido nucleico recombinante" y "ADN recombinante", tal y como se utilizan en la presente memoria, se refieren a combinaciones de al menos dos secuencias de ácido nucleico que no se encuentran de forma natural en una célula eucariota o procariota. Las secuencias de ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, vectores de ácido nucleico, elementos reguladores de la expresión génica, orígenes de replicación, secuencias génicas adecuadas que cuando se expresan confieren resistencia a los antibióticos, secuencias codificadoras de proteínas y similares. El término "polipéptido recombinante" incluye un polipéptido producido mediante técnicas de ADN recombinante que es distinto de un polipéptido natural, ya sea en su localización, pureza o estructura. Generalmente, dicho polipéptido recombinante está presente en una célula en una cantidad diferente a la que normalmente se observa en la naturaleza.

Los términos "operativamente" u "operativamente vinculado", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a la configuración de las secuencias de codificación y control con el fin de realizar la función deseada. Por lo tanto, las secuencias de control vinculadas de forma operativa a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Una secuencia codificadora está vinculada de forma operativa o bajo el control de regiones reguladoras de la transcripción en una célula cuando la ADN polimerasa se une a la secuencia promotora y transcribe la secuencia codificadora en ARNm que puede traducirse en la proteína codificada. No es necesario que las secuencias de control sean contiguas a la secuencia codificante, a condición de que funcionen para dirigir su expresión. Así, por ejemplo, puede haber secuencias intermedias no traducidas pero transcritas entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora puede seguir considerándose "operativamente unida" a la secuencia codificante.

Los términos "heterólogo" y "exógeno", en lo que respecta a las secuencias de ácido nucleico, tal como las secuencias codificantes y las secuencias de control, denotan secuencias que no están normalmente asociadas con una región de una construcción recombinante o con un *locus* cromosómico particular, y/o no están normalmente asociadas con una célula particular. Por lo tanto, una región "heteróloga" de una construcción de ácido nucleico es un segmento identificable de ácido nucleico dentro de otra molécula de ácido nucleico o unido a esta que no se encuentra asociado a la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de una punta de construcción puede incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias que no se encuentran asociadas a la secuencia codificante en la naturaleza. Otro ejemplo de secuencia codificante heteróloga es una construcción en la que la propia secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). Del mismo modo, una célula huésped transformada con una construcción que no está normalmente presente en la célula huésped se consideraría heteróloga a efectos de esta invención.

Preferentemente, el promotor se modifica por medio de la adición o supresión de secuencias, o se sustituye por secuencias alternativas, incluyendo secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Muchos promotores eucariotas contienen dos tipos de secuencias de reconocimiento: la caja TATA y los elementos promotores corriente arriba. El primero, situado corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción participa en la dirección de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción en el sitio correcto, mientras que el segundo parece determinar la tasa de transcripción y se encuentra corriente arriba de la caja TATA. Los elementos potenciadores también pueden estimular la transcripción a partir de promotores vinculados, pero muchos funcionan exclusivamente en un tipo de célula particular. Muchos elementos potenciadores/promotores derivados de virus, por ejemplo el SV40, el virus del sarcoma de Rous (RSV) y los promotores del CMV, son activos en una amplia gama de tipos de células y se denominan "constitutivos" o "ubicuos". La secuencia de ácido nucleico insertada en el sitio de clonación puede tener cualquier marco de lectura abierto que codifique un polipéptido de interés, con la condición de que cuando la secuencia codificadora codifique un polipéptido de interés, debe carecer de sitios de empalme crípticos que puedan bloquear la producción de moléculas de ARNm apropiadas y/o producir moléculas de ARNm aberrantemente empalmadas o anormales.

La región de terminación que se emplea principalmente será una de conveniencia, dado que las regiones de terminación parecen ser relativamente intercambiables. La región de terminación puede ser nativa de la secuencia de ácido nucleico de interés, o puede derivarse de otra fuente.

El término "terapia localizada", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier molécula terapéutica localizada a cualquier aspecto del sistema inmunitario.

- El término "vector", tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un polinucleótido compuesto por ADN o ARN monocatenario, bicatenario, circular o superenrollado. Un vector típico puede estar compuesto por los siguientes elementos unidos operativamente a distancias apropiadas para permitir la expresión funcional del gen: origen de replicación, promotor, potenciador, secuencia líder de ARNm en 5', sitio de unión ribosomal, casete de ácido nucleico, sitios de terminación y poliadenilación, y secuencias marcadoras seleccionables. Uno o varios de estos elementos pueden omitirse en aplicaciones específicas. El casete de ácido nucleico puede incluir un sitio de restricción para la inserción de la secuencia de ácido nucleico a expresar. En un vector funcional, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de ácido nucleico que debe expresarse, incluidos los sitios de iniciación y terminación de la traducción.
- Se construye un vector de manera tal que la secuencia codificadora particular se ubique en el vector con las secuencias reguladoras adecuadas, siendo el posicionamiento y la orientación de la secuencia codificadora con respecto a las secuencias de control de forma que la secuencia codificadora se transcriba bajo el "control" de las secuencias de control o reguladoras. La modificación de las secuencias que codifican la proteína particular de interés puede ser deseable para lograr este fin. Por ejemplo, en algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia para que pueda unirse a las secuencias de control con la orientación adecuada; o para mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden ligarse a la secuencia codificadora antes de su inserción en un vector. Alternativamente, la secuencia codificadora puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contenga las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado que esté en el marco de lectura con las secuencias de control y bajo su control regulador.
- El término "vector basado en lentivirus", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un vector lentiviral diseñado para insertar de forma operativa una secuencia de polinucleótidos exógena en el genoma del huésped de forma específica. Los vectores de focalización basados en lentivirales pueden basarse en, pero sin limitación, por ejemplo, el VIH-1, el VIH-2, el virus de la inmunodeficiencia simia (VIS) o el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF). Preferentemente, el vector de localización basado en lentivirus es un vector de localización basado en VIH. Este vector puede comprender toda o una parte de la secuencia polinucleotídica del VIH.

Los términos "transformación" y "transducción" denotan la introducción de un polinucleótido en una célula o células receptoras.

Combinación de inmunoterapia farmacorresistente con inhibidores de puntos de control inmunitarios

- Una limitación mayor a los tratamientos de quimioterapia para el cáncer es la toxicidad inducida por fármacos que causa la muerte de células inmunocompetentes y la pérdida de un sistema inmunitario eficaz que, de otro modo, evitaría infecciones indeseables o proporcionaría una defensa contra las células cancerosas. Una estrategia para combatir los graves efectos tóxicos de la quimioterapia consistiría en modificar genéticamente de forma selectiva las células inmunocompetentes citotóxicas por medio de la introducción de vectores retrovirales diseñados para expresar secuencias de ADNc que confieren resistencia a los fármacos, que pueden localizar activamente contra aquellas células cancerosas capaces de resistir la administración simultánea de un agente quimioterapéutico.

- Las proteínas de punto de control inmunitario regulan la función de las células T en el sistema inmunitario. Las células T desempeñan un papel fundamental en la inmunidad celular. Las proteínas de punto de control interactúan con ligandos específicos que envían una señal a la célula T y esencialmente apagan o inhiben la función de la célula T. Las células cancerosas se aprovechan de este sistema impulsando altos niveles de expresión de proteínas de punto de control en su superficie, lo que resulta en el control de las células T que expresan proteínas de punto de control en la superficie de las células T que entran en el microambiente tumoral, suprimiendo así la respuesta inmune anticancerígena. Como tal, la inhibición de las proteínas de punto de control daría lugar a la restauración de la función de las células T y una respuesta inmune a las células cancerosas. Entre los ejemplos de proteínas de punto de control se incluyen CTLA-4, PDL1 (B7-H1, CD274), PDL2 (B7-DC, CD273), PD1, B7-H3 (CD276), B7-H4 (B7-S1, B7x, VCTN1), BTLA (CD272), HVEM, TIM3 (HAVcr2), GAL9, LAG3 (CD223), VISTA, KIR, 2B4 (CD244; pertenece a la familia de moléculas CD2 y se expresa en todos los linfocitos NK, $\gamma\delta$ y linfocitos T^{CD8+} ($\alpha\beta$) de memoria), CD160 (también denominado BY55), CGEN-15049, quinasas CHK 1 y CHK2, OX40, A2aR y diversos ligandos de la familia B-7.

- La proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) es una molécula proteica de superficie celular de 288 aminoácidos que se expresa en células T y pro-B y desempeña un papel en su destino/diferenciación. PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, que son miembros de la familia B7. PD-L1 se regula al alza en macrófagos y células dendríticas (DC) en respuesta al tratamiento con LPS y GM-CSF, y en células T y B tras la señalización de los receptores de células TCR y B. PD-1 regula negativamente las respuestas de las células T.

- PD-1 desempeña un papel en el escape tumor-específico de la vigilancia inmune. Se ha demostrado que PD-1 se expresa en gran medida en los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de tumores, tanto en la leucemia mielógena crónica (LMC) como en la leucemia mielógena aguda (LMA). PD-1 también se regula al alza en los linfocitos T infiltrantes de melanoma (TIL) [Dotti (2009) Blood 114 (8): 1457-58]. Se ha descubierto que los tumores expresan los ligandos PDL-1 y PDL-2 de PD-1. Por ejemplo, PDL-1 se encuentra en el glioblastoma, especialmente en el subtipo mesenquimal. Nat Rev Neurol 2015 11: 504-515). La expresión de PDL-1 y PDL-2 por los tumores, combinada con la

regulación al alza de PD-1 en los CTL, puede ser un factor que contribuya a la pérdida de funcionalidad de las células T y a la incapacidad de los CTL para mediar una respuesta antitumoral eficaz. Los investigadores han demostrado que en ratones infectados crónicamente con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), la administración de anticuerpos anti-PD-1 bloqueó la interacción PD-1-PDL y fue capaz de restaurar parte de la funcionalidad de las células T (proliferación y secreción de citocinas), y conducir a una disminución de la carga viral (Barber et al (2006) Nature 439 (9): 682-687).

Las propias células tumorales expresan PD-L1 y se cree que limitan las respuestas de las células T a través de este mecanismo. Además, se ha demostrado que la inhibición de PD-1 produce una expansión de las células T efectoras y una restricción de la población de células T reguladoras en modelos de melanoma B16. El bloqueo de PD-1, CTLA-4 o IDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa) restablece la producción de IL-2 y permite una mayor proliferación de las células T CD8+ presentes en el microentorno tumoral. Se ha demostrado que el tratamiento anti-PDL1 rescata y permite la expansión de las células T CD8+ generadas por la vacuna antígeno-específica para rechazar el tumor. Estos datos sugieren que el eje PD-1/PD-L1 regula las células T tumorales específicas activadas.

Los ensayos clínicos en melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas y carcinoma de células renales han demostrado respuestas antitumorales en algunos pacientes con bloqueo anti-PD-1. También se han descrito beneficios significativos con la inhibición de PD-1 en casos de melanoma avanzado, cáncer de pulmón no microcítico, próstata, células renales, vejiga y cáncer colorrectal. Los estudios en modelos murinos han aplicado estas pruebas a la terapia del glioma. Se ha descrito una disminución de las Tregs infiltrantes del tumor y un aumento de la supervivencia cuando se administró un tratamiento combinatorio de inhibidores de IDO, CTLA-4 y PD-L1.

Hay varios inhibidores de PD-1 que se están probando actualmente en ensayos clínicos. CT-01 1 es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado contra PD-1. Recientemente se ha completado un ensayo clínico de fase II en individuos con linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) que se han sometido a un trasplante autólogo de células madre. Los resultados preliminares demostraron que el 70% de los individuos estaban libres de progresión al final del periodo de seguimiento, frente al 47% del grupo de control, y que el 82% de los individuos estaban vivos, frente al 62% del grupo de control. Este ensayo determinó que CT-011 no sólo bloquea la función de PD-1, sino que también aumenta la actividad de las células asesinas naturales, intensificando así la respuesta inmunitaria antitumoral.

BMS 936558 es un anticuerpo monoclonal IgG4 totalmente humano dirigido contra agentes PD-1. En un ensayo de fase I, la administración bisemanal de BMS-936558 en individuos con neoplasias malignas avanzadas refractarias al tratamiento mostró regresiones parciales o completas duraderas. La tasa de respuesta más significativa se observó en individuos con melanoma (28%) y carcinoma de células renales (27%), pero también se observó una actividad clínica sustancial en individuos con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), y algunas respuestas persistieron durante más de un año. También se toleró relativamente bien; el grado ≥ 3 en el 14% de los individuos.

BMS 936559 es un anticuerpo monoclonal IgG4 totalmente humano que localiza al ligando PD-1 PD-L1. Los resultados de la fase I demostraron que la administración quincenal de este fármaco producía respuestas duraderas, especialmente en individuos con melanoma. Las tasas de respuesta objetiva oscilaron entre el 6% y el 17% dependiendo del tipo de cáncer en individuos con CPNM, melanoma, CCR o cáncer de ovario en estadio avanzado, y algunos individuos experimentaron respuestas que duraron un año o más.

MK 3475 es un anticuerpo monoclonal IgG4 anti-PD-1 humanizado en fase I de desarrollo en un estudio de cinco partes que evalúa la dosificación, seguridad y tolerabilidad del fármaco en individuos con carcinoma, melanoma o CPNM progresivo, localmente avanzado o metastásico.

MPDL 3280A es un anticuerpo monoclonal, que también se dirige a PD-L1, en fase I de pruebas en combinación con el inhibidor de BRAF vemurafenib en individuos con melanoma metastásico mutante para BRAF V600 y en combinación con bevacizumab, que se dirige al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), con o sin quimioterapia en individuos con tumores sólidos avanzados.

AMP 224 es una proteína de fusión del dominio extracelular del segundo ligando de PD-1, PD-L2, e IgG1, que tiene el potencial de bloquear la interacción PD-L2/PD-1. AMP-224 se encuentra actualmente en fase I de pruebas como monoterapia en individuos con cáncer avanzado.

Medi 4736 es un anticuerpo anti-PD-L1 en ensayos clínicos de fase I en individuos con melanoma maligno avanzado, carcinoma de células renales, CPNM y cáncer colorrectal.

CTLA4 (proteína asociada a linfocitos T citotóxicos 4) es un receptor proteico que, al actuar como punto de control inmunitario, regula a la baja el sistema inmunitario. CTLA4 se encuentra en la superficie de las células T, que dirigen el ataque inmunitario celular contra los antígenos. El ataque de las células T puede activarse estimulando el receptor CD28 de la célula T. El ataque de las células T puede desactivarse estimulando el receptor CTLA4. La primera inmunoterapia de su clase, el ipilimumab (YERVOY®), un anticuerpo monoclonal dirigido contra el CTLA-4 en la superficie de las células T, se destinó al tratamiento del melanoma.

En la presente memoria descriptiva se describe un procedimiento para tratar el cáncer en un individuo que lo necesita, que comprende la administración al individuo de un agente terapéutico en combinación con una célula

5 inmunocompetente resistente a fármacos y un inhibidor de puntos de control inmunitario. Preferentemente, el inhibidor de punto de control es un tratamiento biológico o una molécula pequeña. Preferentemente, el inhibidor de punto de control es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano, una proteína de fusión o una combinación de los mismos. Preferentemente, el inhibidor de punto de control inhibe una proteína del punto de control que puede ser CTLA-4, PDL1 o PD1. Preferentemente, el inhibidor de punto de control interactúa con un ligando de una proteína del punto de control que puede ser CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, OX40, A2aR, ligandos de la familia B-7 o una combinación de los mismos.

El agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

10 Preferentemente, la célula inmunocompetente farmacorresistente, el agente terapéutico y el inhibidor de puntos de control se administran simultáneamente, o secuencialmente en cualquier orden, ya sea individualmente, o uno seguido de los otros dos simultáneamente, o dos simultáneamente seguidos del tercero. Preferentemente, la célula inmunocompetente resistente al fármaco se administra antes que el agente terapéutico y el inhibidor de puntos de control inmunitario. Preferentemente, el inhibidor de punto de control es un inhibidor de PD-1 o un inhibidor de CTLA-4.

15 La población de células inmunitarias citotóxicas utilizadas en la invención comprende células T $\gamma\delta$. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas comprende aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de células T $\gamma\delta$. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas comprende entre un 50% y un 95% de células T $\gamma\delta$. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas utilizadas en la invención comprende células T $\gamma\delta$ y células natural killer (NK). Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas comprende aproximadamente un 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o más de células NK. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas comprende entre un 5% y un 25% de células NK.

20 Preferentemente, las composiciones aisladas de células inmunitarias citotóxicas utilizadas en la invención comprenden células T $\gamma\delta$, células NK o cualquier combinación de las mismas y, opcionalmente, comprenden además otras células inmunocompetentes que incluyen, pero no se limitan a: monocitos, macrófagos y células dendríticas en las que más de aproximadamente el 50% o más de las células inmunitarias citotóxicas presentes en la composición expresan un polipéptido que confiere resistencia a un agente quimioterapéutico. Preferentemente, las composiciones aisladas de células inmunitarias citotóxicas utilizadas de acuerdo con la invención comprenden células T $\gamma\delta$ en las que al menos aproximadamente el 50% o más de las células T $\gamma\delta$ expresan un polipéptido que confiere resistencia a un agente quimioterapéutico. Preferentemente, el polipéptido que confiere resistencia a un agente quimioterápico es la O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT), una variante resistente a los fármacos de dihidrofolato reductasa (L22Y-DHFR), timidilato sintasa, proteína de resistencia a múltiples fármacos-1 (MDR1).

25 En la presente memoria descriptiva se describen procedimientos para tratar el cáncer en un individuo que comprenden: administrar a un individuo que lo necesita un inhibidor de punto de control inmunitario en combinación con un agente quimioterapéutico y una composición resistente a la quimioterapia de células inmunocompetentes que comprenden células T $\gamma\delta$, células NK o cualquier combinación de las mismas y, además, opcionalmente, comprenden otras células inmunocompetentes que incluyen, entre otras: monocitos, macrófagos y células dendríticas que están modificadas genéticamente para expresar un polipéptido que confiere resistencia al agente quimioterapéutico. La generación y expansión de composiciones que comprenden células T $\gamma\delta$ resistentes a fármacos, células NK o cualquier combinación de las mismas *ex vivo* puede permitir, en este contexto, la administración de una terapia basada en células inmunocompetentes simultáneamente con quimioterapia e inhibidores de puntos de control, mejorando potencialmente la eliminación del tumor mientras se establece y mantiene la inmunidad antitumoral, lo que posiblemente podría conducir a la eliminación del tumor a largo plazo. Preferentemente, las células inmunocompetentes están modificadas genéticamente para expresar al menos uno, al menos dos, al menos tres o más restos de reconocimiento tumoral diferentes, en los que cada resto de reconocimiento tumoral reconoce un antígeno tumoral.

30 Divulgados en la presente memoria descriptiva están procedimientos para tratar cánceres, y en particular tumores cancerosos. La invención combina el uso de agentes quimioterapéuticos que pueden matar o reducir la proliferación de las células cancerosas, con la inmunoterapia para eliminar eficazmente las células cancerosas que desarrollan resistencia a fármacos o que escapan al agente quimioterapéutico. La invención proporciona para aislar células inmunes citotóxicas, incluyendo, pero sin limitación, células T $\gamma\delta$ ya sea de un paciente a tratar o de otra fuente, como se describe, por ejemplo, por Lamb L.S. en la Patente de los EE.UU. . Núm. 7,078,034. Las células aisladas pueden entonces transfectarse con un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica un polipéptido que confiere a la célula resistencia a un agente quimioterapéutico seleccionado. El paciente que necesita tratamiento para un cáncer, y en particular un tumor, puede entonces recibir una dosis, o dosis, de las células T transfectadas antes, después o con el agente quimioterapéutico y el inhibidor de punto de control. El agente en sí mismo, aunque pretende ser tóxico para las células cancerosas diana, y reduce la proliferación y viabilidad de las células, también puede inducir el microambiente del tumor para reducir la inmunosupresión local derivada del tumor y mejorar la migración de células dentro del tumor, así como la formación en la superficie celular de las células cancerosas de proteínas relacionadas con el estrés. Las células T $\gamma\delta$ transfectadas, por ejemplo, tienen la

característica de ser capaces de reconocer y, por lo tanto, de dirigirse a dichos ligandos relacionados con el estrés, dirigiéndose así de forma específica o preferente a las células cancerosas.

5 Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas genéticamente modificadas, tal como las células T $\gamma\delta$, pueden entregarse al tumor diana directamente por medio de, tal como, pero sin limitarse a, la inyección directa en la masa tumoral, la administración a un vaso sanguíneo que entra en la masa tumoral, o una de sus combinaciones. Por ejemplo, se contempla que las células pueden ser entregadas a una masa glioblastomal en el cerebro de un paciente por implantación directa a través de una aguja canulada o un catéter insertado en la masa tumoral, posresección intracavitaria, intraperitoneal o intraventricular.

10 En algunos protocolos que combinan la inmunoterapia y la quimioterapia para tratar los cánceres en un paciente humano o animal, las citoquinas (IL-2, IL-12, GM-CSF y similares) pueden administrarse a un paciente para impulsar la formación de linfocitos citotóxicos. En otros procedimientos, se puede emplear un anticuerpo específico anti-CD137. El CD137 es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF)/factor de crecimiento nervioso (NGF) y se expresa en los linfocitos T y B activados y en los monocitos; se ha descubierto que su ligando desempeña un papel importante en la regulación de las respuestas inmunitarias. Un anticuerpo monoclonal anti-CD137 puede
15 unirse específicamente a las células inmunitarias que expresan CD137, tal como las células T activadas y las células dendríticas (CD) de ratón recién aisladas, estimulando así una respuesta inmunitaria, en particular de células T citotóxicas, contra las células tumorales.

20 Divulgados en la presente memoria descriptiva están procedimientos para el tratamiento de un cáncer en un paciente, que comprenden las etapas de: obtener una población de células inmunes citotóxicas aisladas, en el que las células inmunes citotóxicas aisladas han sido modificadas genéticamente para ser resistentes a un agente terapéutico; administrar a un paciente que lo necesita, una cantidad efectiva del agente terapéutico; y administrar al paciente la población de células inmunes citotóxicas aisladas genéticamente modificadas, con lo que las células inmunes citotóxicas se entregan al tumor, reduciendo de este modo el cáncer en el paciente.

25 Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas son células T $\gamma\delta$. Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas son células T $\gamma\delta$ y células natural killer (NK). Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas son células T $\gamma\delta$, células NK y, además, pueden incluir otras células inmunocompetentes, entre las que se incluyen: monocitos, macrófagos y células dendríticas. preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas pueden aislarse del paciente que padece el cáncer. preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas pueden aislarse de una fuente distinta del paciente con cáncer.

30 Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas son células T $\gamma\delta$ derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC). Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas son células T $\gamma\delta$ y células NK derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC). Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas se derivan de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) y son células T $\gamma\delta$, células NK y, además, pueden incluir otras células inmunocompetentes que incluyen, entre otras: monocitos, macrófagos y células dendríticas. Preferentemente, las células madre pluripotentes pueden aislarse del paciente que padece el cáncer.
35 Preferentemente, las células madre pluripotentes pueden aislarse de una fuente distinta del paciente con cáncer.

40 Preferentemente, el agente terapéutico está caracterizado por una célula que desarrolla resistencia a dicho agente terapéutico cuando la célula recibe un ácido nucleico heterólogo, y en el que el ácido nucleico heterólogo se expresa en la célula. Preferentemente, el agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico citotóxico seleccionado del grupo formado por: agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida); antagonistas metabólicos (por ejemplo, metotrexato (MTX), 5-fluorouracilo o derivados de los mismos); agentes desmetilantes del ADN (también conocidos como antimetabolitos; por ejemplo, azacitidina); un nucleótido sustituido; un nucleósido sustituido; antibióticos antitumorales (por ejemplo, mitomicina, adriamicina); agentes antitumorales derivados de plantas (por ejemplo, vincristina, vindesina, Taxol[®], paclitaxel, abraxano); cisplatino; carboplatino; etopósido; y similares. Dichos
45 agentes pueden incluir, además, pero sin limitación, los agentes anticancerígenos trimetorexato (TMTX), temozolomida, raltritrexed, S-(4-Nitrobencil)-6-tioinosina (NBMPR), 6-bencilguanidina (6-BG), nitrosoureas [por ejemplo, bis-cloronitrosourea (BCNU; carmustina) lomustina (CCNU) +/- Procarbacin y Vincristina (PCV régimen), fotomustina]; citarabina y captotecina, o un derivado terapéutico de cualquiera de estos.

50 Preferentemente, la etapa de obtener una población de células inmunitarias citotóxicas modificadas genéticamente para ser resistentes a un agente terapéutico comprende: obtener de un individuo, tal como un individuo humano o animal, una población de células inmunitarias citotóxicas, por ejemplo, obteniendo una muestra biológica del individuo, incluida, entre otras, una muestra de sangre o de tejido, incluida una biopsia tumoral. Opcionalmente, la muestra puede enriquecerse en células inmunitarias citotóxicas y otras células inmunocompetentes y/o las células presentes en la muestra pueden expandirse para aumentar la población de las células presentes en la muestra. Las células están
55 preferiblemente transfectadas de forma estable con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo unida de forma operable a un promotor, en el que la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido que confiere a la célula resistencia a uno o más agentes terapéuticos tal como el agente quimioterapéutico. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas transfectadas de forma estable puede mantenerse de forma viable.

Preferentemente, el agente terapéutico puede ser trimetotrexato o metotrexato, y la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica la dihidrofolato reductasa, o uno de sus derivados. Preferentemente, el agente terapéutico puede ser temozolomida, o un derivado terapéutico del mismo, y la secuencia de ácido nucleico heteróloga puede codificar la O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa, o uno de sus derivados. Preferentemente, el agente quimioterapéutico puede ser cisplatino, doxorubicina o paclitaxel, o un derivado terapéuticamente activo de los mismos, y la secuencia de ácido nucleico heteróloga puede codificar la proteína de resistencia a múltiples fármacos-1 (MDR1), o un derivado de la misma.

Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas genéticamente modificadas aisladas, el agente terapéutico y el inhibidor de punto de control inmunitario pueden administrarse al paciente. Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas modificadas genéticamente, el agente terapéutico y el inhibidor de punto de control inmunitario pueden administrarse secuencialmente al paciente. Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas modificadas genéticamente, el agente terapéutico y el inhibidor de punto de control inmunitario pueden administrarse concomitantemente al paciente. Preferentemente, las células inmunitarias citotóxicas genéticamente modificadas se administran al paciente directamente en el tumor o en un vaso sanguíneo proximal y que deriva en el tumor. Preferentemente, el fosfolípido es un glioblastoma.

Preferentemente, el inhibidor de punto de control inmunitario puede ser una terapia biológica o una molécula pequeña. Preferentemente, el inhibidor de punto de control es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano, una proteína de fusión, un fragmento de unión a antígeno o una combinación de los mismos. En la presente invención, el inhibidor de punto de control inhibe una proteína del punto de control que puede ser CTLA-4, PDL1 o PD1. El inhibidor de punto de control puede interactuar con un ligando de una proteína del punto de control que puede ser CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, OX40, ligandos de la familia B-7 o una combinación de los mismos. Entre los inhibidores de puntos de control inmunitarios ilustrativos se incluyen Tremelimumab (anticuerpo bloqueante de CTLA-4), anti-OX40, anticuerpo monoclonal PD-L1 (Anti-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (bloqueante de PD-1), OPDIVO[®]/Nivolumab (anticuerpo anti-PD1), CT-011 (anticuerpo anti-PD1), anticuerpo monoclonal BY55, AMP224 (anticuerpo anti-PDL1), BMS-936559 (anticuerpo anti-PDL1), MPLDL3280A (anticuerpo anti-PDL1), MSB0010718C (anticuerpo anti-PDL1) y YERVOY[®]/ipilimumab (inhibidor de punto de control anti-CTLA-4). Los ligandos de proteína de punto de control incluyen, pero no se limitan a PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CD86 y TIM-3.

Preferentemente, la presente invención utiliza una clase de fármacos inhibidores de puntos de control inmunitario que inhiben CTLA-4. Los agentes antagonistas anti-CTLA4 adecuados para su uso en la invención incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-CTLA4 humanos, anticuerpos anti-CTLA4 de ratón, anticuerpos anti-CTLA4 de mamífero, anticuerpos anti-CTLA4 humanizados, anticuerpos anti-CTLA4 monoclonales, anticuerpos anti-CTLA4 policlonales, anticuerpos quiméricos anti-CTLA4, MDX-010 (ipilimumab), tremelimumab, anticuerpos anti-CD28, adnectinas anti-CTLA4, anticuerpos de dominio anti-CTLA4, fragmentos anti-CTLA4 de cadena simple, fragmentos anti-CTLA4 de cadena pesada, fragmentos anti-CTLA4 de cadena ligera e inhibidores de CTLA4 que agonizan la vía coestimuladora. Preferentemente, los antagonistas anti-CTLA4 adicionales incluyen, entre otros, los siguientes cualquier inhibidor capaz de alterar la capacidad del antígeno CD28 de unirse a su ligando cognado, de inhibir la capacidad de CTLA4 de unirse a su ligando cognado, de aumentar las respuestas de células T a través de la vía coestimuladora, de alterar la capacidad de B7 de unirse a CD28 y/o CTLA4, de alterar la capacidad de B7 de activar la vía coestimuladora, alterar la capacidad de CD80 de unirse a CD28 y/o CTLA4, alterar la capacidad de CD80 de activar la vía coestimuladora, alterar la capacidad de CD86 de unirse a CD28 y/o CTLA4, alterar la capacidad de CD86 de activar la vía coestimuladora, e impedir que se active la vía coestimuladora en general. Esto incluye necesariamente inhibidores de moléculas pequeñas de CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora; anticuerpos dirigidos contra CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora; moléculas antisentido dirigidas contra CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora; adnectinas dirigidas contra CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora, inhibidores de ARNi (tanto de cadena simple como doble) de CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora, entre otros antagonistas anti-CTLA4.

Preferentemente, los agentes inmunoestimulantes, los factores de crecimiento de células T y las interleuquinas pueden utilizarse en combinación con inhibidores de puntos de control e inmunoterapia farmacorresistente. Los agentes inmunoestimulantes son sustancias (fármacos y nutrientes) que estimulan el sistema inmunitario induciendo la activación o aumentando la actividad de cualquiera de sus componentes. Los inmunoestimulantes incluyen, entre otros, vacunas bacterianas, factores estimulantes de colonias, interferones, interleucinas, otros inmunoestimulantes, vacunas terapéuticas, combinaciones de vacunas y vacunas víricas. Los factores de crecimiento de células T son proteínas que estimulan la proliferación de células T. Algunos ejemplos de factores de crecimiento de células T son IL-2, IL-7, IL-15, IL-17, IL21 e IL-33.

Preferentemente, la invención utiliza composiciones que comprenden al menos un inhibidor de puntos de control y una población aislada de células inmunitarias citotóxicas que comprenden células T $\gamma\delta$, en las que más del 50% aproximadamente de la población de células inmunitarias citotóxicas expresa un polipéptido que confiere resistencia a un agente quimioterapéutico. Preferentemente, la composición comprende al menos un inhibidor de puntos de control y una población aislada de células inmunitarias citotóxicas que comprende células T $\gamma\delta$ y células NK, en la que

entre el 50% y el 95% de la población de células inmunitarias citotóxicas son células T $\gamma\delta$ y entre el 5% y el 25% de la población de células inmunitarias citotóxicas son células NK.

Preferentemente, la composición terapéutica, inhibidora de puntos de control inmunitarios, terapéutica biológica o farmacéutica tal como se desvela en la presente memoria descriptiva puede administrarse a un individuo por diversas vías, incluyendo, por ejemplo, por vía oral o parenteral, tal como por vía intravenosa, intramuscular subcutánea, intraorbital, intracapsular, intraperitoneal, intrarrectal, intracisternal, intratumoral, intravascular, intradérmica o por medio de absorción pasiva o facilitada a través de la piel mediante el uso de, por ejemplo, un parche cutáneo o iontoforesis transdérmica, respectivamente. La composición terapéutica, inhibidora de puntos de control, terapéutica biológica o farmacéutica también puede administrarse en el lugar de una afección patológica, por ejemplo, por vía intravenosa o intraarterial en un vaso sanguíneo que irriga un tumor.

Preferentemente, el inhibidor de punto de control inmunitario se administra en menos de 0,0001 mg/kg, 0,0001-0,001 mg/kg, 0,001-0,01 mg/kg, 0,01-0,05 mg/kg, 0,05-0,1 mg/kg, 0,1-0,2 mg/kg, 0,2-0,3 mg/kg, 0,3-0,5 mg/kg, 0,5-0,7 mg/kg, 0,7-1 mg/kg, 1-2 mg/kg, 2-3 mg/kg, 3-4 mg/kg, 4-5 mg/kg, 5-6 mg/kg, 6-7 mg/kg, 7-8 mg/kg, 8-9 mg/kg, 9-10 mg/kg, al menos 10 mg/kg, o cualquier combinación de dosis. Preferentemente, el inhibidor de puntos de control se administra al menos una vez a la semana, al menos dos veces a la semana, al menos tres veces a la semana, al menos una vez cada dos semanas, o al menos una vez al mes o varios meses. Preferentemente, el inhibidor de puntos de control se administra en una dosis única, en dos dosis, en tres dosis, en cuatro dosis, en cinco dosis, o en 6 o más dosis.

Divulgados en la presente memoria descriptiva están sistemas para tratar un cáncer en un paciente que comprenden un agente terapéutico citotóxico que tiene las características de inhibir la supervivencia de una célula cancerosa, y una población aislada de células inmunes citotóxicas, en el que las células inmunes citotóxicas están genéticamente modificadas para ser resistentes al agente terapéutico, y un inhibidor de punto de control inmunitario. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas comprende células T $\gamma\delta$, células NK o cualquier combinación de las mismas. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas comprende células T $\gamma\delta$ y células asesinas naturales y, opcionalmente, comprende otras células inmunocompetentes. Preferentemente, la población de células inmunitarias citotóxicas puede comprender una secuencia de ácido nucleico heteróloga unida de forma operable a un promotor, donde la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica un polipéptido que cuando se expresa en una célula confiere resistencia al agente terapéutico a la célula. Preferentemente, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en: un agente alquilante (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida); un antagonista metabólico (por ejemplo, metotrexato (MTX), 5-fluorouracilo o derivados de los mismos); un agente desmetilante del ADN (también conocido como antimetabolitos; por ejemplo, azacitidina); un nucleótido sustituido; un nucleósido sustituido; un antibiótico antitumoral (por ejemplo, mitomicina, adriamicina); un agente antitumoral derivado de plantas (por ejemplo, vincristina, vindesina, Taxol[®], paclitaxel, abraxano); cisplatino; carboplatino; etopósido; y similares. Dichos agentes pueden incluir, además, pero sin limitación, los agentes anticancerígenos trimetorexato (TMTX), temozolomida, raltritrexed, S-(4-Nitrobencil)-6-tioinosina (NBMPR), 6-bencilguanidina (6-BG), nitrosoureas [por ejemplo, bis-cloronitrosourea (BCNU); carmustina] lomustina (CCNU) +/- Procarbacin y Vincristina (PCV régimen), fotomustina; citarabina y captotecina, o un derivado terapéutico de cualquiera de estos. Preferentemente, el agente terapéutico es trimetotrexato o metotrexato, y la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica la dihidrofolato reductasa, o uno de sus derivados. Preferentemente, el agente terapéutico es temozolomida, o un derivado terapéutico del mismo, y la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica la O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT), o uno de sus derivados. Preferentemente, el agente terapéutico es una nitrosourea, o un derivado terapéutico del mismo, y la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica la O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT), o uno de sus derivados.

Preferentemente, el inhibidor de punto de control inmunitario es una terapia biológica o una molécula pequeña. Preferentemente, el inhibidor de punto de control es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano, una proteína de fusión, un fragmento de unión a antígeno o una combinación de los mismos. El inhibidor de punto de control inhibe una proteína del punto de control que puede ser CTLA-4, PDL1 o PD1. El inhibidor de punto de control puede interactuar con un ligando de una proteína del punto de control que puede ser CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, OX40, ligandos de la familia B-7 o una combinación de los mismos. Entre los inhibidores de puntos de control inmunitarios ilustrativos se incluyen Tremelimumab (anticuerpo bloqueante de CTLA-4), anti-OX40, anticuerpo monoclonal PD-L1 (Anti-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (bloqueante de PD-1), OPDIVO[®]/Nivolumab (anticuerpo anti-PD1), CT-011 (anticuerpo anti-PD1), anticuerpo monoclonal BY55, AMP224 (anticuerpo anti-PDL1), BMS-936559 (anticuerpo anti-PDL1), MPLDL3280A (anticuerpo anti-PDL1), MSB0010718C (anticuerpo anti-PDL1) y YERVOY[®]/Ipilimumab (inhibidor de punto de control anti-CTLA-4). Los ligandos de proteína de punto de control incluyen, pero no se limitan a PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CD86 y TIM-3.

Preferentemente, la presente invención utiliza una clase de fármacos inhibidores de puntos de control que inhiben CTLA-4. Los agentes antagonistas anti-CTLA4 adecuados para su uso en la invención incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-CTLA4 humanos, anticuerpos anti-CTLA4 de ratón, anticuerpos anti-CTLA4 de mamífero, anticuerpos anti-CTLA4 humanizados, anticuerpos anti-CTLA4 monoclonales, anticuerpos anti-CTLA4 policlonales, anticuerpos quiméricos anti-CTLA4, MDX-010 (ipilimumab), tremelimumab, anticuerpos anti-CD28, adnectinas anti-CTLA4, anticuerpos de dominio anti-CTLA4, fragmentos anti-CTLA4 de cadena simple, fragmentos

anti-CTLA4 de cadena pesada, fragmentos anti-CTLA4 de cadena ligera e inhibidores de CTLA4 que agonizan la vía coestimuladora.

5 Preferentemente, los antagonistas anti-CTLA4 adicionales incluyen, entre otros, los siguientes cualquier inhibidor capaz de alterar la capacidad del antígeno CD28 de unirse a su ligando cognado, de inhibir la capacidad de CTLA4 de unirse a su ligando cognado, de aumentar las respuestas de células T a través de la vía coestimuladora, de alterar la capacidad de B7 de unirse a CD28 y/o CTLA4, de alterar la capacidad de B7 de activar la vía coestimuladora, alterar la capacidad de CD80 de unirse a CD28 y/o CTLA4, alterar la capacidad de CD80 de activar la vía coestimuladora, alterar la capacidad de CD86 de unirse a CD28 y/o CTLA4, alterar la capacidad de CD86 de activar la vía coestimuladora, e impedir que se active la vía coestimuladora en general. Esto incluye necesariamente inhibidores de moléculas pequeñas de CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora; anticuerpos dirigidos contra CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora; moléculas antisentido dirigidas contra CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora; adnectinas dirigidas contra CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora, inhibidores de ARNi (tanto de cadena simple como doble) de CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora, entre otros antagonistas anti-CTLA4.

15 Preferentemente, pueden utilizarse agentes inmunoestimulantes, factores de crecimiento de células T e interleucinas. Los agentes inmunoestimulantes son sustancias (fármacos y nutrientes) que estimulan el sistema inmunitario induciendo la activación o aumentando la actividad de cualquiera de sus componentes. Los inmunoestimulantes incluyen, entre otros, vacunas bacterianas, factores estimulantes de colonias, interferones, interleucinas, otros inmunoestimulantes, vacunas terapéuticas, combinaciones de vacunas y vacunas víricas. Los factores de crecimiento de células T son proteínas que estimulan la proliferación de células T. Algunos ejemplos de factores de crecimiento de células T son IL-2, IL-7, IL-15, IL-17, IL21 e IL-33.

20 Preferentemente, la composición terapéutica, inhibidora de puntos de control, terapéutica biológica o farmacéutica según se desvela en la presente memoria descriptiva puede administrarse a un individuo por diversas vías, incluyendo, por ejemplo, por vía oral o parenteral, tal como por vía intravenosa, intramuscular subcutánea, intraorbital, intracapsular, intraperitoneal, intrarrectal, intracisternal, intratumoral, intravascular, intradérmica o por absorción pasiva o facilitada a través de la piel mediante el uso de, por ejemplo, un parche cutáneo o iontoforesis transdérmica, respectivamente. La composición terapéutica, inhibidora de puntos de control, terapéutica biológica o farmacéutica también puede administrarse en el lugar de una afección patológica, por ejemplo, por vía intravenosa o intraarterial en un vaso sanguíneo que irriga un tumor.

25 Preferentemente, la cantidad total de un agente a administrar en la práctica de la invención puede administrarse a un individuo como dosis única, ya sea como bolo o por infusión durante un periodo de tiempo relativamente corto, o puede administrarse mediante el uso de un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran múltiples dosis durante un periodo de tiempo prolongado. Un experto en la materia sabría que la cantidad de la composición para tratar una condición patológica en un individuo depende de muchos factores, incluyendo la edad y el estado general de salud del individuo, así como la vía de administración y el número de tratamientos a administrar. Teniendo en cuenta estos factores, el artesano experto ajustaría la dosis particular según fuera necesario.

30 Preferentemente, el inhibidor de punto de control se administra en menos de 0,0001 mg/kg, 0,0001-0,001 mg/kg, 0,001-0,01 mg/kg, 0,01-0,05 mg/kg, 0,05-0,1 mg/kg, 0,1-0,2 mg/kg, 0,2-0,3 mg/kg, 0,3-0,5 mg/kg, 0,5-0,7 mg/kg, 0,7-1 mg/kg, 1-2 mg/kg, 2-3 mg/kg, 3-4 mg/kg, 4-5 mg/kg, 5-6 mg/kg, 6-7 mg/kg, 7-8 mg/kg, 8-9 mg/kg, 9-10 mg/kg, al menos 10 mg/kg, o cualquier combinación de dosis. Preferentemente, el inhibidor de puntos de control se administra al menos una vez a la semana, al menos dos veces a la semana, al menos tres veces a la semana, al menos una vez cada dos semanas, o al menos una vez al mes o varios meses. Preferentemente, el inhibidor de puntos de control se administra en una dosis única, en dos dosis, en tres dosis, en cuatro dosis, en cinco dosis, o en 6 o más dosis.

35 Divulgados en la presente memoria descriptiva están sistemas para tratar un glioblastoma en un paciente que comprende un agente terapéutico que tiene las características de inhibir la supervivencia de una célula cancerosa e inducir una proteína de estrés en la célula cancerosa, y una población aislada de células inmunes citotóxicas, en el que dichas células inmunes citotóxicas comprenden células T $\gamma\delta$, células NK o cualquier combinación de las mismas, y aún más opcionalmente comprenden otras células inmunocompetentes y en las que la población de células inmunes citotóxicas han sido modificadas genéticamente para ser resistentes al agente terapéutico, y un inhibidor del punto de control. Preferentemente, la población de células inmunes citotóxicas comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga unida de forma operable a un promotor, en el que la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica un polipéptido que cuando se expresa en una célula confiere resistencia al agente terapéutico a la célula.

40 Preferentemente, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en: un agente alquilante, un antagonista metabólico, un antibiótico antitumoral y un agente antitumoral derivado de plantas.

45 Preferentemente, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: trimetotrexato (TMTX), metotrexato (MTX), temozolomida, reltritrexed, S-(4-nitrobencil)-6-tioinosina (NBMPR), camptotecina, 6-bencilguanidina, citarabina y un derivado terapéutico de cualquiera de ellos.

Preferentemente, el agente terapéutico es trimetotrexato o metotrexato, y la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica la dihidrofolato reductasa, o uno de sus derivados.

Preferentemente, el inhibidor de punto de control inmunitario puede ser una terapia biológica o una molécula pequeña. Preferentemente, el inhibidor de punto de control es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano, una proteína de fusión, un fragmento de unión a antígeno o una combinación de los mismos. El inhibidor de punto de control inhibe una proteína del punto de control que puede ser CTLA-4, PDL1 o PD1. El inhibidor de punto de control puede interactuar con un ligando de una proteína del punto de control que puede ser CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, OX40, ligandos de la familia B-7 o una combinación de los mismos. Entre los inhibidores de puntos de control inmunitarios ilustrativos se incluyen Tremelimumab (anticuerpo bloqueante de CTLA-4), anti-OX40, anticuerpo monoclonal PD-L1 (Anti-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (bloqueante de PD-1), OPDIVO®/Nivolumab (anticuerpo anti-PD1), CT-011 (anticuerpo anti-PD1), anticuerpo monoclonal BY55, AMP224 (anticuerpo anti-PDL1), BMS-936559 (anticuerpo anti-PDL1), MPLDL3280A (anticuerpo anti-PDL1), MSB0010718C (anticuerpo anti-PDL1) y YERVOY®/ipilimumab (inhibidor de punto de control anti-CTLA-4). Los ligandos de proteína de punto de control incluyen, pero no se limitan a PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CD86 y TIM-3.

Preferentemente, la presente invención utiliza una clase específica de fármacos inhibidores de puntos de control inmunitario que inhiben CTLA-4. Los agentes antagonistas anti-CTLA4 adecuados para su uso en la invención incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-CTLA4 humanos, anticuerpos anti-CTLA4 de ratón, anticuerpos anti-CTLA4 de mamífero, anticuerpos anti-CTLA4 humanizados, anticuerpos anti-CTLA4 monoclonales, anticuerpos anti-CTLA4 policlonales, anticuerpos quiméricos anti-CTLA4, MDX-010 (ipilimumab), tremelimumab, anticuerpos anti-CD28, adnectinas anti-CTLA4, anticuerpos de dominio anti-CTLA4, fragmentos anti-CTLA4 de cadena simple, fragmentos anti-CTLA4 de cadena pesada, fragmentos anti-CTLA4 de cadena ligera e inhibidores de CTLA4 que agonizan la vía coestimuladora.

Preferentemente, los antagonistas anti-CTLA4 adicionales incluyen, entre otros, los siguientes cualquier inhibidor capaz de alterar la capacidad del antígeno CD28 de unirse a su ligando cognado, de inhibir la capacidad de CTLA4 de unirse a su ligando cognado, de aumentar las respuestas de células T a través de la vía coestimuladora, de alterar la capacidad de B7 de unirse a CD28 y/o CTLA4, de alterar la capacidad de B7 de activar la vía coestimuladora, alterar la capacidad de CD80 de unirse a CD28 y/o CTLA4, alterar la capacidad de CD80 de activar la vía coestimuladora, alterar la capacidad de CD86 de unirse a CD28 y/o CTLA4, alterar la capacidad de CD86 de activar la vía coestimuladora, e impedir que se active la vía coestimuladora en general. Esto incluye necesariamente inhibidores de moléculas pequeñas de CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora; anticuerpos dirigidos contra CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora; moléculas antisentido dirigidas contra CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora; adnectinas dirigidas contra CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora, inhibidores de ARNi (tanto de cadena simple como doble) de CD28, CD80, CD86, CTLA4, entre otros miembros de la vía coestimuladora, entre otros antagonistas anti-CTLA4.

Preferentemente, pueden utilizarse agentes inmunoestimulantes, factores de crecimiento de células T e interleucinas. Los agentes inmunoestimulantes son sustancias (fármacos y nutrientes) que estimulan el sistema inmunitario induciendo la activación o aumentando la actividad de cualquiera de sus componentes. Los inmunoestimulantes incluyen, entre otros, vacunas bacterianas, factores estimulantes de colonias, interferones, interleucinas, otros inmunoestimulantes, vacunas terapéuticas, combinaciones de vacunas y vacunas víricas. Los factores de crecimiento de células T son proteínas que estimulan la proliferación de células T. Algunos ejemplos de factores de crecimiento de células T son IL-2, IL-7, IL-15, IL-17, IL21 e IL-33.

Preferentemente, la composición terapéutica, inhibidora de puntos de control inmunitarios, terapéutica biológica o farmacéutica tal como se desvela en la presente memoria descriptiva puede administrarse a un individuo por diversas vías, incluyendo, por ejemplo, por vía oral o parenteral, tal como por vía intravenosa, intramuscular subcutánea, intraorbital, intracapsular, intraperitoneal, intrarrectal, intracisternal, intratumoral, intravascular, intradérmica o por medio de absorción pasiva o facilitada a través de la piel mediante el uso de, por ejemplo, un parche cutáneo o iontoforesis transdérmica, respectivamente. La composición terapéutica, inhibidora de puntos de control, terapéutica biológica o farmacéutica también puede administrarse en el lugar de una afección patológica, por ejemplo, por vía intravenosa o intraarterial en un vaso sanguíneo que irriga un tumor.

Preferentemente, la cantidad total de un agente a administrar en la práctica de la invención puede administrarse a un individuo como dosis única, ya sea como bolo o por infusión durante un periodo de tiempo relativamente corto, o puede administrarse mediante el uso de un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran múltiples dosis durante un periodo de tiempo prolongado. Un experto en la materia sabría que la cantidad de la composición para tratar una condición patológica en un individuo depende de muchos factores, incluyendo la edad y el estado general de salud del individuo, así como la vía de administración y el número de tratamientos a administrar. Teniendo en cuenta estos factores, el artesano experto ajustaría la dosis particular según fuera necesario.

Preferentemente, el inhibidor de punto de control se administra en menos de 0,0001 mg/kg, 0,0001-0,001 mg/kg, 0,001-0,01 mg/kg, 0,01-0,05 mg/kg, 0,05-0,1 mg/kg, 0,1-0,2 mg/kg, 0,2-0,3 mg/kg, 0,3-0,5 mg/kg, 0,5-0,7 mg/kg, 0,7-

1 mg/kg, 1-2 mg/kg, 2-3 mg/kg, 3-4 mg/kg, 4-5 mg/kg, 5-6 mg/kg, 6-7 mg/kg, 7-8 mg/kg, 8-9 mg/kg, 9-10 mg/kg, al menos 10 mg/kg, o cualquier combinación de dosis. Preferentemente, el inhibidor de puntos de control se administra al menos una vez a la semana, al menos dos veces a la semana, al menos tres veces a la semana, al menos una vez cada dos semanas, o al menos una vez al mes o varios meses. Preferentemente, el inhibidor de puntos de control se administra en una dosis única, en dos dosis, en tres dosis, en cuatro dosis, en cinco dosis, o en 6 o más dosis.

Cabe señalar que las relaciones, las concentraciones, las cantidades y otros datos numéricos pueden expresarse en la presente memoria en un formato de intervalo. Debe entenderse que dicho formato de intervalo se utiliza por conveniencia y brevedad, y, por lo tanto, debe interpretarse de manera flexible para incluir no sólo los valores numéricos explícitamente recitados como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subintervalos abarcados dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y subintervalo se recitara explícitamente. Para ilustrar, un intervalo de concentración de "aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5%" debe interpretarse de manera que incluya no sólo la concentración explícitamente recitada de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso, sino que también incluya las concentraciones individuales (por ejemplo, 1%, 2%, 3% y 4%) y los subintervalos (por ejemplo, 0,5%, 1,1%, 2,2%, 3,3% y 4,4%) dentro del intervalo indicado. El término "aproximadamente" puede incluir $\pm 1\%$, $\pm 2\%$, $\pm 3\%$, $\pm 4\%$, $\pm 5\%$, $\pm 6\%$, $\pm 7\%$, $\pm 8\%$, $\pm 9\%$, o $\pm 10\%$, o más del valor o valores numéricos que se modifican. Además, el término "aproximadamente 'x' a 'y'" incluye "aproximadamente 'x' a 'y'".

Pueden hacerse muchas variaciones y modificaciones a la invención descrita anteriormente. Todas estas modificaciones y variaciones están incluidas en el ámbito de la presente divulgación y protegidas por las siguientes reivindicaciones.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen a título ilustrativo y no deben interpretarse como limitativos de la invención reivindicada en modo alguno.

Ejemplo 1- Paradigmas de tratamiento del cáncer

Se utiliza una terapia combinada que comprende un agente quimioterapéutico, células $\gamma\delta$ -T resistentes a fármacos y/o células asesinas naturales resistentes a fármacos, y un inhibidor o inhibidores de puntos de control inmunitarios para tratar al paciente con cáncer. El agente quimioterapéutico es seleccionado de agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosamida), antagonistas metabólicos (por ejemplo, metotrexato (MTX), 5-fluorouracilo o sus derivados), antibióticos antitumorales (por ejemplo, mitomicina, adriamicina), agentes antitumorales derivados de plantas (por ejemplo, vincristina, vindesina, Taxol®), cisplatino, carboplatino, etopósido y similares. Tales agentes pueden incluir, además, pero no se limitan a, los agentes anticancerígenos trimetotrexato (TMTX), temozolomida, raltritrexed, S-(4-Nitrobenzil)-6-tioinosina (NBMPR), 6-bencilguanidina (6-BG), bis-cloronitrosourea (BCNU) citarabina y campotecina, o un derivado terapéutico de cualquiera de estos. Las células $\gamma\delta$ -T resistentes al fármaco y las células asesinas naturales son resistentes al agente quimioterapéutico. El (los) inhibidor(es) de punto de control inmunitario se utiliza(n) solo(s) o en combinación con otros inhibidores de puntos de control inmunitario, y se selecciona(n) entre los inhibidores de las proteínas del punto de control inmunitario CTLA-4 PDL1 (B7-H1, CD274), PDL2 (B7-DC, CD273), PD1, B7-H3 (CD276), B7-H4 (B7-S1, B7x, VCTN1), BTLA (CD272), HVEM, TIM3 (HAVcr2), GAL9, LAG3 (CD223), VISTA, KIR, 2B4 (CD244; pertenece a la familia de moléculas CD2 y se expresa en todos los linfocitos NK, $\gamma\delta$ y linfocitos T CD8⁺ ($\alpha\beta$) de memoria), CD160 (también denominado BY55), CGEN-15049, quinasas CHK 1 y CHK2, OX40, A2aR y diversos ligandos de la familia B-7.

Evaluación de la actividad de la inmunoterapia en combinación con la quimioterapia

Los criterios de evaluación de la respuesta incluyen la evaluación basada en Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (WHO; World Health Organization Offset Publication Núm. 48, 1979); RECIST (Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos; J Natl Cancer Inst 2000; 92:205-16; Eisenhauer EA et al., Eur J Cancer 2009;45:228-47); Criterios de respuesta inmunorrelacionados (Jedd WE et al., Clin Cancer Res 2009;15(23),7412-7420); e iRANO (Immunotherapy Response Assessment in Neuro-Oncology; Okada H et al., Lancet Oncol 2015 nov; 16(15):e534-42).

Resultados

La quimioterapia como terapia combinada que comprende además células $\gamma\delta$ -T resistentes a los fármacos (y/o células citotóxicas naturales resistentes a los fármacos) y un inhibidor o inhibidores de las proteínas de punto de control inmunitario produce una respuesta antitumoral mejorada o prolongada; una respuesta médicamente beneficiosa; actividad antitumoral aditiva o sinérgica, en comparación con la quimioterapia sola, o la quimioterapia combinada con células $\gamma\delta$ -T resistentes a fármacos (y/o células natural killer resistentes a fármacos); reducción de las lesiones iniciales, sin nuevas lesiones; regresión tumoral; enfermedad estable duradera con posible disminución constante de la carga tumoral total; respuesta tras un aumento de la carga tumoral total; y respuesta en presencia de nuevas

lesiones. Otros hallazgos clínicos pueden incluir un aumento de los linfocitos infiltrantes del tumor, medido por un aumento del tamaño del tumor, y la promoción de la supervivencia a largo plazo.

Por ejemplo, los tumores tratados con temozolomida (TMZ) expresan un mayor número de ligandos de estrés en la superficie de la célula tumoral, tales como MICA, MICB y ULBP1-6. La destrucción de las células tumorales se ve facilitada por las células $\gamma\delta$ -T resistentes a los fármacos y/o las células asesinas naturales resistentes a los fármacos cuyo receptor o receptores, tal como NKG2D, reconocen los ligandos de estrés específicos del tumor. Sin embargo, las células tumorales pueden escindir enzimáticamente MICA y MICB, liberando MICA y MICB solubles. Cuando se unen a los receptores de las células efectoras en el plasma, esto puede conducir a una regulación a la baja de la expresión del receptor, lo que resulta en un escape inmunológico. Se ha observado que quimioterapias tal como la TMZ aumentan la expresión de ligandos de estrés en la superficie celular del tejido tumoral sin aumentar significativamente la concentración de los ligandos solubles en el plasma. Los pacientes que responden a los anticuerpos inhibidores de CTLA-4 han demostrado la capacidad de producir una respuesta humoral contra los ligandos NKG2D tal como la MICA. Estas respuestas dan lugar a una reducción de MICA soluble, lo que puede permitir que la expresión amplificada del ligando de estrés en la superficie del tumor potencie la destrucción de células tumorales por las células $\gamma\delta$ -T resistentes a los fármacos y/o las células asesinas naturales resistentes a los fármacos.

Ejemplo 2- Análisis de la expresión y función de moléculas de punto de control en gliomas y células T $\gamma\delta$

Se evaluó la expresión de moléculas de punto de control en células $\gamma\delta$ T fabricadas con GMP y células tumorales de glioblastoma y se evaluó la función de las células $\gamma\delta$ T enriquecidas *in vitro*.

Procedimientos

20 Expansión ex vivo de células T $\gamma\delta$

Los productos de aféresis humana recogidos de donantes sanos se compraron a Hemacare (Van Nuys CA). Los productos se trasladaron a las instalaciones GMP del Laboratorio de Terapia Celular de la UAB. Para la cultura estática: Todas las manipulaciones se realizaron en una campana de flujo laminar de Clase 100 rodeada de un flujo de aire clasificado como Clase 10K/ISO 7. El producto se diluyó v/v con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) y las células mononucleares se aislaron por separación en gradiente de densidad sobre Ficoll (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Se cosechó la interfase y se lavó X2 en HBSS. El sedimento celular se resuspendió en medio libre de suero CTS™ OpTmizer™ T Cell Expansion (ThermoFisher Scientific; Waltham, MA) suplementado con ácido zoledrónico 2mM (Novartis; Basel HV) y 100u/mL IL2 (Miltenyi Biotec Ltd; Bergisch Gladbach, Alemania). Las células se cultivaron en matraces estándar T150 o T75. Para cultivo en sistema cerrado: Todas las operaciones, incluida la preparación de medios, reservas y tampones, se realizaron en salas blancas ISO 7 bajo cabinas de bioseguridad, mediante el uso de reactivos de calidad GMP. La separación automatizada del producto por medio de Ficoll y el cultivo se llevaron a cabo en el biorreactor CLINIMACS PRODIGY® (Miltenyi Biotec Ltd; Bergisch Gladbach, Alemania) mediante el uso de un programa de procesamiento celular personalizado y el juego de tubos TS520. A continuación, las células se expandieron en la unidad CentriCult del CLINIMACS PRODIGY® mediante el uso de una combinación de zoledronato (Zometa; Novartis, Basilea) e interleucina-2 (Miltenyi Biotec Ltd; Bergisch Gladbach, Alemania) (ZOL/IL-2), en cultivo sin suero OpTmizer (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA). El cultivo se mantuvo a una densidad de 1-2x 10⁶ células/ml y se suplementó con IL-2 100u/mL en días alternos hasta la recolección de las células en el día 13. El procedimiento se supervisó continuamente para determinar la cinética de expansión y el fenotipo en comparación con el cultivo a pequeña escala en matraces a intervalos regulares. Tras 13 días de cultivo, las células T $\gamma\delta$ expandidas fueron fenotipadas y se determinó su citotoxicidad frente a líneas celulares de leucemia estándar y células tumorales de glioma.

Análisis de citometría de flujo

Se utilizó el análisis multiparamétrico de citometría de flujo para determinar el fenotipo y el perfil funcional en PBMC de donantes y productos cultivados. Se utilizó el subconjunto de células T DuraClone (Beckman Coulter) más el panel anti-PD-1, anti-CTLA-4 y anti-PD-L1 para monitorizar la expresión de la molécula de punto de control y el enriquecimiento de células T $\gamma\delta$ por medio de citometría de flujo. Se analizaron muestras de producto los días 1 y 13 de cultivo. Se analizó la expresión de PD-L1 en células tumorales de glioblastoma derivadas de PDX recién disociadas por medio de citometría de flujo. La suspensión unicelular de células de glioblastoma derivadas de PDX se bloqueó con FcR Block (Biolegend) durante 15 min, antes de la tinción con el anticuerpo PD-L1 y el isotipo respectivo (IgG1). Las células teñidas se adquirieron en el citómetro de flujo BD fortessa X-20.

Evaluación de la citotoxicidad por medio de citometría de flujo

La potencia del producto celular se determinó por medio de ensayos de citotoxicidad *in vitro* contra células K562. En el día 13 se evaluó la citotoxicidad de las células T $\gamma\delta$ expandidas sobre líneas celulares leucémicas humanas (K562) y células tumorales (JX22T, JX12T Y JX59T) por medio de un ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo. El kit básico de ensayo de citotoxicidad ([https:// immunochemistry.com](https://immunochemistry.com)) incluye dos reactivos fluorescentes: CFSE y

7-AAD. Para marcar las células diana (K562) se utilizó CFSE, una tinción de membrana verde fluorescente. Las células efectoras no teñidas se añaden en proporción creciente de efector a diana y se incuban con las células diana durante cuatro horas antes de añadir 7-AAD, una tinción vivo/muerto fluorescente roja, seguida de la adquisición y análisis por medio de citómetro de flujo. La citotoxicidad se calcula como el porcentaje de células diana verdes que se detectan canal rojo. Fórmula para el % de citotoxicidad = $\# \text{ Células muertas} / \# \text{ Células vivas} + \# \text{ Células muertas} * 100$.

Resultados y Discusión

PBMC recién aisladas de dos donantes sanos (donante 1: 043692 donante 2: 043988) para la expansión de células T $\gamma\delta$ *in vitro*. Al examinar la expresión de los puntos de control por medio de citometría de flujo, observamos una regulación al alza de PD-1 y CTLA-4 y PD-L1 en las células T $\gamma\delta$ expandidas. En el día 13, el aumento de PD-1 fue superior al 20%, y la expresión de CTLA-4 osciló entre el 3 y el 6%. Curiosamente, PD-L1 también estaba regulado al alza (>9%) en ambos donantes, [Figuras 1-4]. No se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de las moléculas de punto de control en las células $\gamma\delta$ T transducidas con MGMT en comparación con las células $\gamma\delta$ T no transducidas. También se observó una moderada regulación a la baja de PD-1 y CTLA-4 en las células T $\gamma\delta$ en reposo (sin IL2 ni ZOL) en comparación con los cultivos estimulados [Figura 5].

La expresión de PD-L1 en células de glioma derivadas de PDX también se analizó por medio de citometría de flujo. En comparación con los controles de isotipo, la expresión del receptor PD-L1 era baja o indetectable. El porcentaje de expresión de PD-L1 varió entre JX12T (0%), JX22T (1,8%) y JX59T (10,4%) [Figura 6].

A continuación, examinamos si el bloqueo de los receptores inhibidores inmunitarios tenía algún efecto sobre la capacidad de las células T $\gamma\delta$ para aumentar la citotoxicidad de las células cancerosas [Figura 7]. Células tumorales de glioma (JX22T, JX12T, JX59T) y K562 (una línea celular establecida a partir de leucemia mielógena crónica) fueron desafiadas con células T $\gamma\delta$ fabricadas en proporción 20:1, en la mezcla de ensayo que contenía uno o más anticuerpos de punto de control a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$. Se observó un alto nivel de actividad citolítica para K562 [PD-L1 (52%), CTLA-4 (5%), CTLA-4+PD-1 (7%), PD-1 (7)]. Se observó un aumento modesto de la lisis de células tumorales en el caso de las células tumorales JX12T para el bloqueo PD-1 (3%), CTLA-4 (2) PD-1+ CTLA-4 (5) combo y PD-L1 (8). Sin embargo, el bloqueo del punto de control no aumentó la citotoxicidad de las células T $\gamma\delta$ modificadas con MGMT para JX22T Y JX59T.

Nuestra observación de que las células tumorales de glioblastoma no expresan niveles significativos de PD-L1 concuerda con los informes ya publicados de Garg et al. [La eficacia preclínica de la monoterapia con puntos de control inmunitarios no reproduce las correspondientes predicciones clínicas basadas en biomarcadores en el glioblastoma. *Oncolmmunology*, 2016]. Un estudio liderado por Joseph et al. encontró un alto nivel de expresión de PD-L1 en las células mieloides infiltrantes del tumor en los tumores de glioblastoma [Las células mieloides infiltrantes tumorales inmunosupresoras median la resistencia inmunitaria adaptativa a través de un mecanismo PD-1/PD-L1 en el glioblastoma, *Neuro-Oncology* 9(6), 796-806, 2017]. Dado que el compartimento mieloides/estromal en el microambiente tumoral del glioma expresa altos niveles de PD-L1 y nuestra observación de que las células T fabricadas por GMP / células $\gamma\delta$ T regulan al alza PD-1, proponemos un plan de tratamiento integral que incluya tratamiento sistémico con PD-1, anticuerpos bloqueantes de PD-L1 y temozolomida e infusión localizada de células $\gamma\delta$ T que expresan MGMT para tratar eficazmente el glioblastoma y lograr una alta tasa de respuesta objetiva.

REIVINDICACIONES

1. Al menos un inhibidor de punto de control inmunitario para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cáncer en un paciente que lo necesite, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - 5 i. obtención de una población ampliada de células inmunitarias citotóxicas aisladas que comprenden células T $\gamma\delta$, en la que más del 50% aproximadamente de las células T $\gamma\delta$ han sido modificadas genéticamente para expresar un polipéptido que confiere resistencia a un agente quimioterapéutico;
 - ii. administrar al paciente una cantidad eficaz del agente quimioterapéutico al que son resistentes las células inmunitarias citotóxicas modificadas genéticamente de la etapa (i);
 - 10 iii. administrar al paciente la población de células inmunitarias citotóxicas modificadas genéticamente de la etapa (i); y
 - iv. administrar al paciente una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de punto de control inmunitario, en el que el inhibidor de punto de control se dirige a PD-1, PDL1 o CTLA-4.
2. El al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para uso de la reivindicación 1, en el que el cáncer se selecciona entre glioma, glioblastoma, linfoma, melanoma, neuroblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales y cáncer de pulmón de células pequeñas.
3. El al menos un inhibidor de punto de control inmunitario para uso de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el polipéptido que confiere resistencia al agente quimioterapéutico es O⁶ metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT), L22Y-DHFR, timidilato sintasa, , o proteína de resistencia a múltiples fármacos-1 (MDR1).
4. El al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el inhibidor de puntos de control inmunitarios se dirige a PDL1.
5. El al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el inhibidor de puntos de control se dirige a PD-1 o CTLA-4.
6. El al menos un inhibidor de punto de control inmunitario para uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el inhibidor de punto de control inmunitario se selecciona de:
 - 25 (i) el inhibidor de CTLA-4: tremelimumab;
 - (ii) los inhibidores de PD-1: AMP224, nivolumab, pembrolizumab y durvalumab; y
 - (iii) los inhibidores de PD-L1: atelizumab, avelumab, ipilimumab y BMS-936559.
7. El al menos un inhibidor de punto de control inmunitario para uso de cualquier reivindicación precedente, en el que el agente quimioterapéutico se selecciona de entre un agente alquilante; un antagonista metabólico; un agente desmetilante del ADN; un nucleótido sustituido; un nucleósido sustituido; un antibiótico antitumoral; un agente antitumoral derivado de plantas; cisplatino; carboplatino; etopósido; metotrexato (MTX); trimetotrexato (TMTX); temozolomida; raltitrexed; S-(4-nitrobencil)-6-tioinosina (NBMPR); 6-benciguanidina (6-BG); una nitrosourea; citarabina; camptotecina; y un derivado terapéutico de cualquiera de ellos.
8. El al menos un inhibidor de punto de control inmunitario para uso de la reivindicación 1, en el que las células inmunitarias citotóxicas aisladas se han modificado genéticamente para ser resistentes a dos agentes quimioterapéuticos seleccionados entre un agente alquilante; un antagonista metabólico; un agente desmetilante del ADN; un nucleótido sustituido; un nucleósido sustituido; un antibiótico antitumoral; un agente antitumoral derivado de plantas; cisplatino; carboplatino; etopósido; metotrexato (MTX); trimetotrexato (TMTX); temozolomida; raltitrexed; S-(4-nitrobencil)-6-tioinosina (NBMPR); 6-benciguanidina (6-BG); una nitrosourea; citarabina; camptotecina; y un derivado terapéutico de cualquiera de ellos.
9. El al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para uso de la reivindicación 8, en el que los dos agentes terapéuticos son temozolomida y metotrexato.
10. El al menos un inhibidor de punto de control inmunitario para uso de la reivindicación 8, en el que las células inmunitarias citotóxicas aisladas expresan un polipéptido seleccionado de alquil guanina transferasa (AGT) y dihidrofolato reductasa.
11. El al menos un inhibidor de punto de control inmunitario para el uso de la reivindicación 7, en el que el agente quimioterapéutico es temozolomida y las células inmunitarias citotóxicas aisladas expresan MGMT.
12. El al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que la administración de las células inmunitarias modificadas genéticamente de la etapa (iii) y la administración de los inhibidores de puntos de control de la etapa (iv) se producen sustancialmente de forma simultánea o secuencial.
- 50 13. El al menos un inhibidor de puntos de control inmunitarios para el uso de cualquier reivindicación precedente, en el que las células inmunitarias citotóxicas aisladas se derivan de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC).

14. El al menos un inhibidor de punto de control inmunitario para uso de la reivindicación 1, en el que la población de células inmunitarias citotóxicas comprende aproximadamente del 50% a aproximadamente el 95% de células T $\gamma\delta$ y comprende aproximadamente del 5% a aproximadamente el 25% de células NK.
- 5 15. El al menos un inhibidor de punto de control inmunitario para uso de la reivindicación 1, en el que el polipéptido que confiere resistencia al agente quimioterapéutico es alquil guanina transferasa (AGT), P140KMGMT, o, dihidrofolato reductasa.

ID del donante: 043692 **Expresión de moléculas de punto de control en células T y δ, antes de cultivo in vitro de PBMC**

Día 1

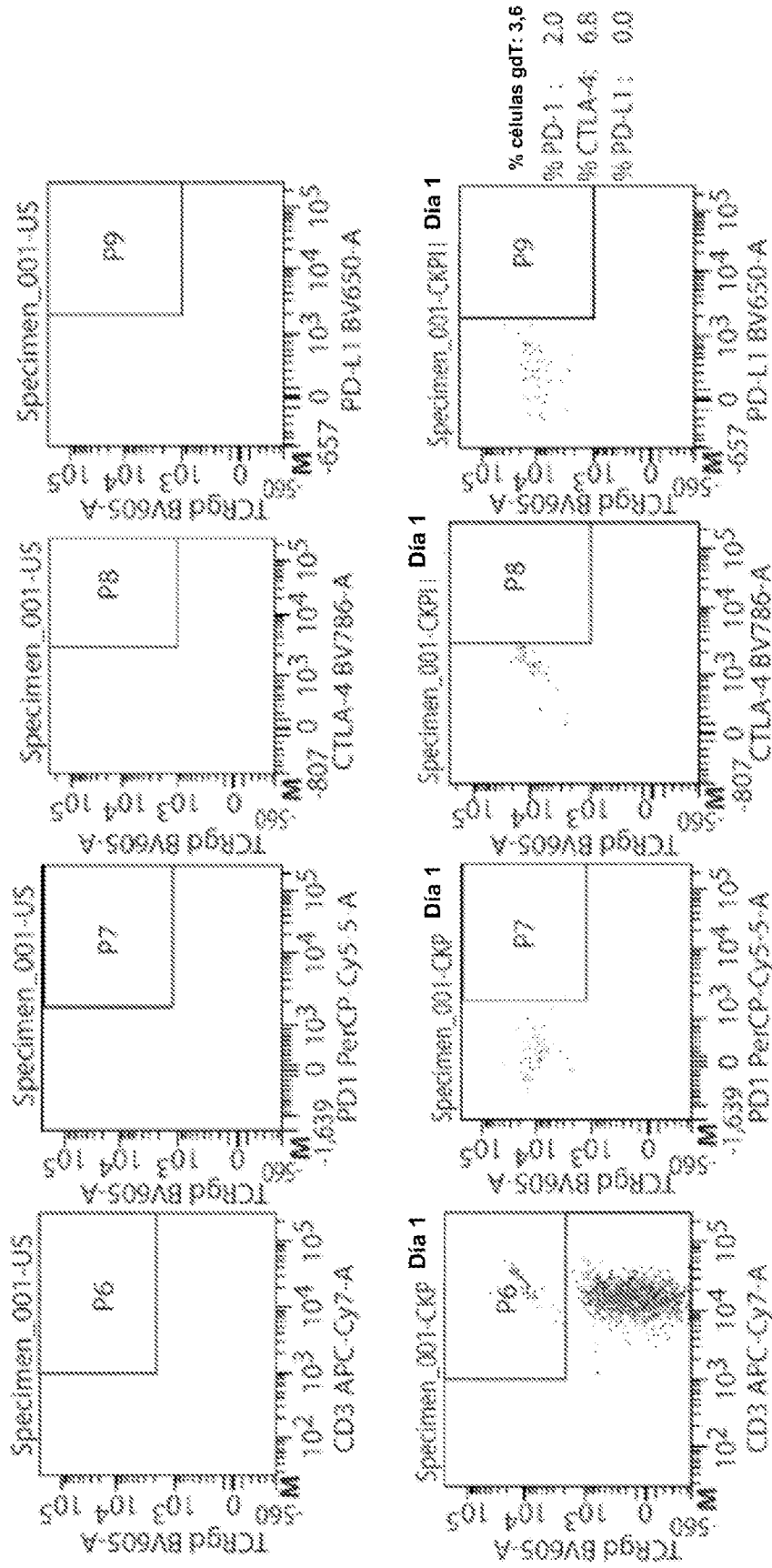


FIG. 1

ID del donante: 043692 **Regulación superior de moléculas de punto de control en células T y δ enriquecidas *in vitro***

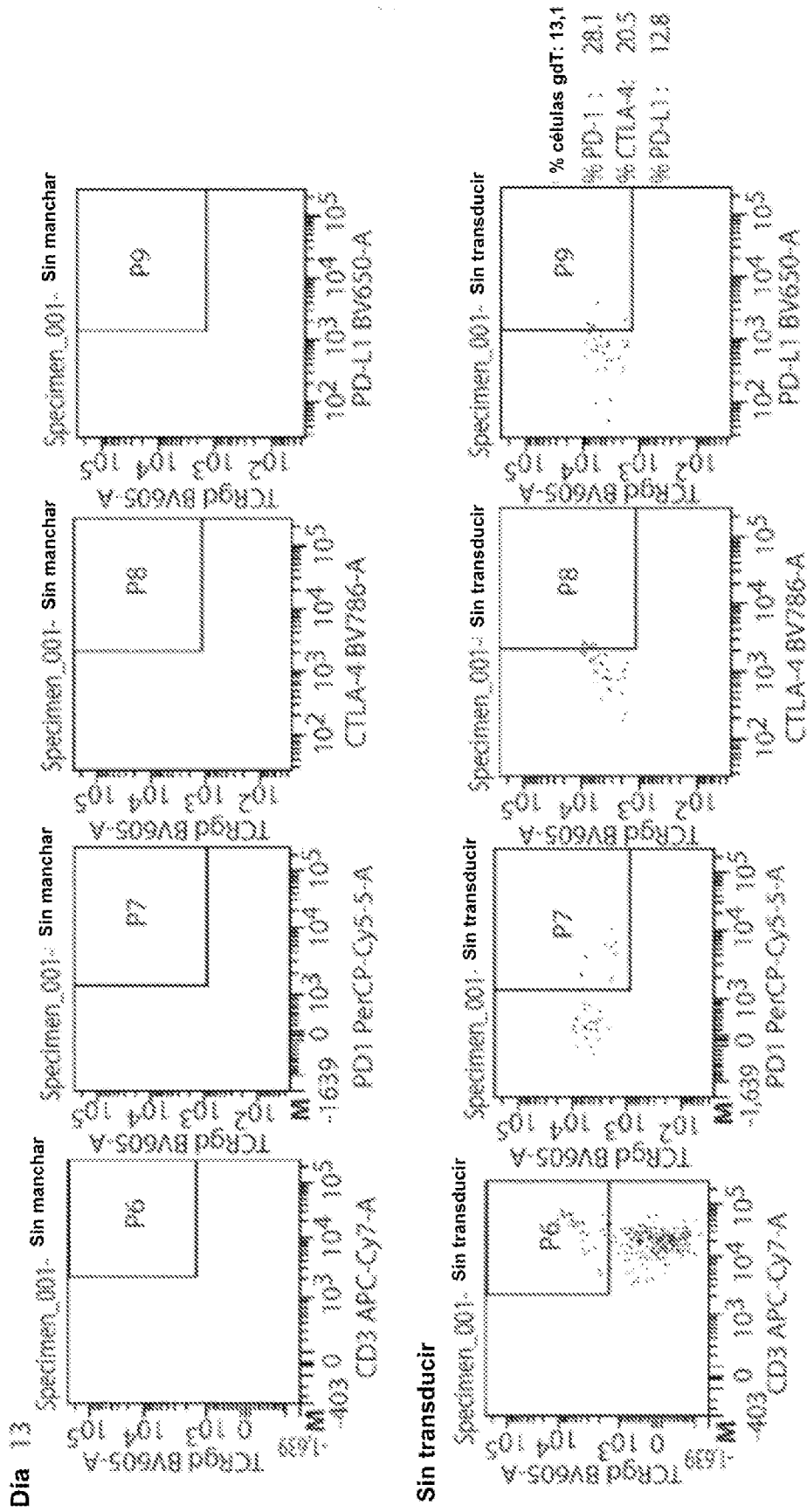


FIG. 2

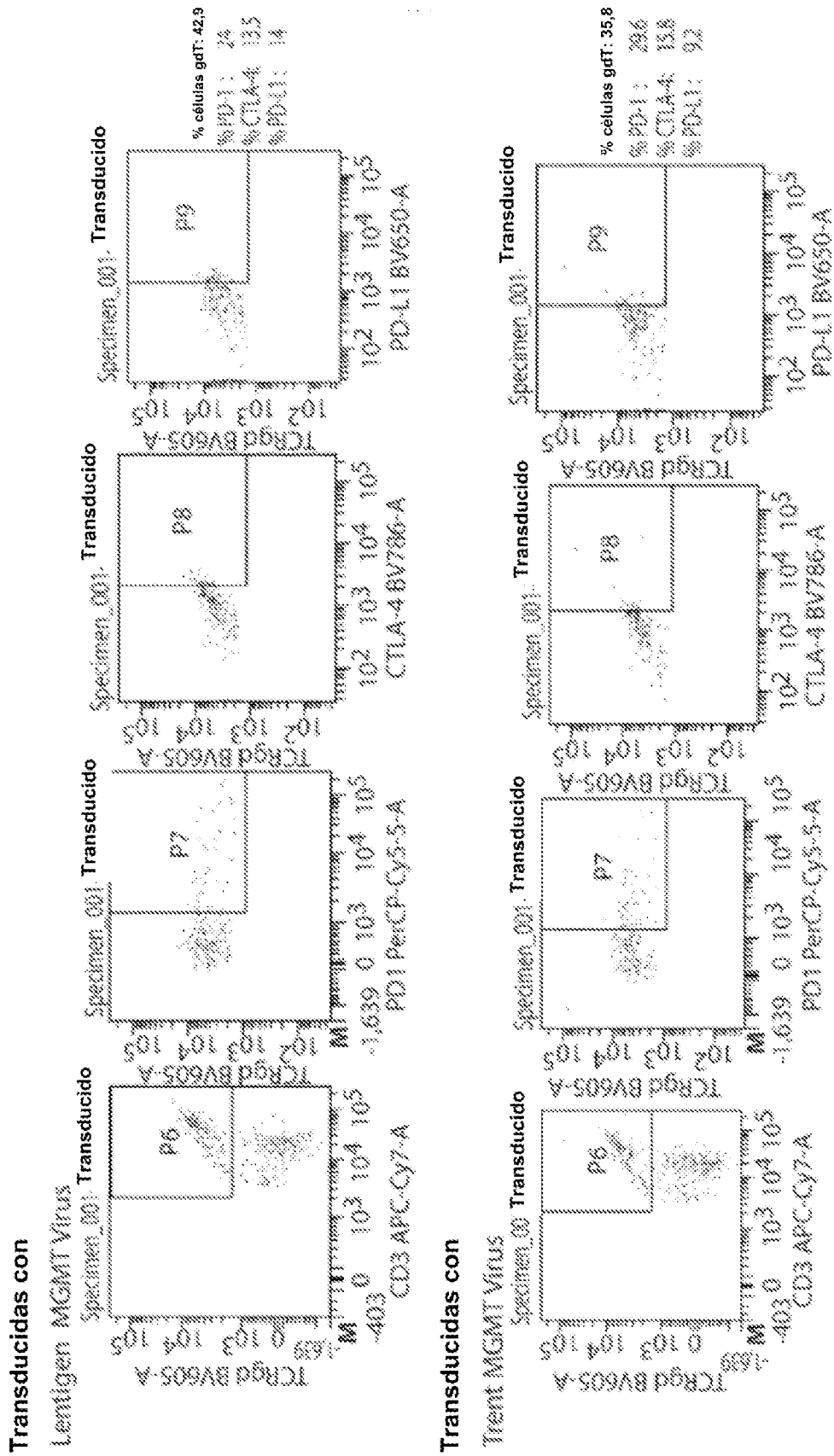


FIG. 2 (Continuada)

ID del donante: 043988 Expresión de moléculas de punto de control en células T yδ, antes de cultivo *in vitro* de PBMC

Día 1

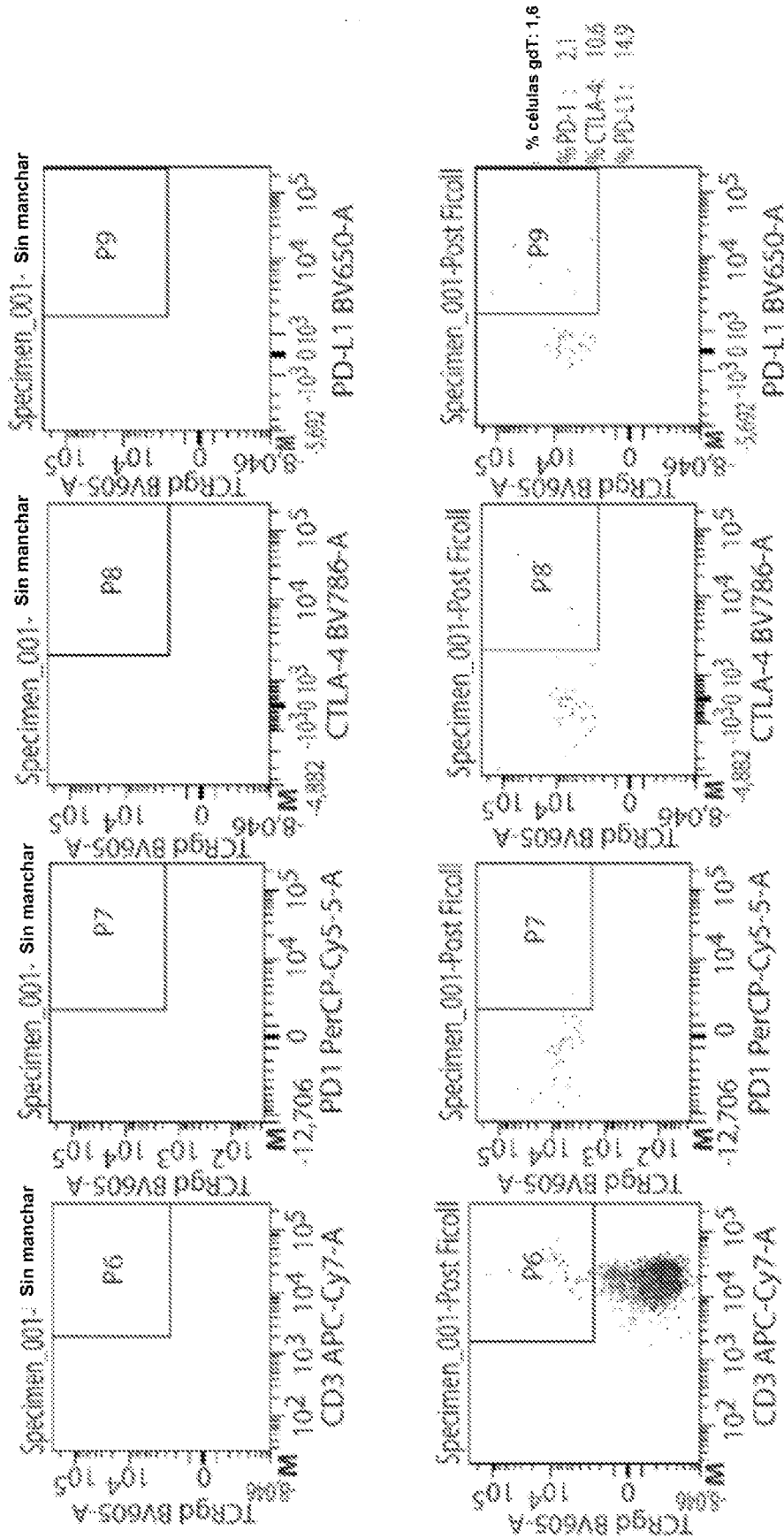


FIG. 3

ID del donante: 043988 Regulación superior de moléculas de punto de control en células T y δ enriquecidas *in vitro*

Día 13:

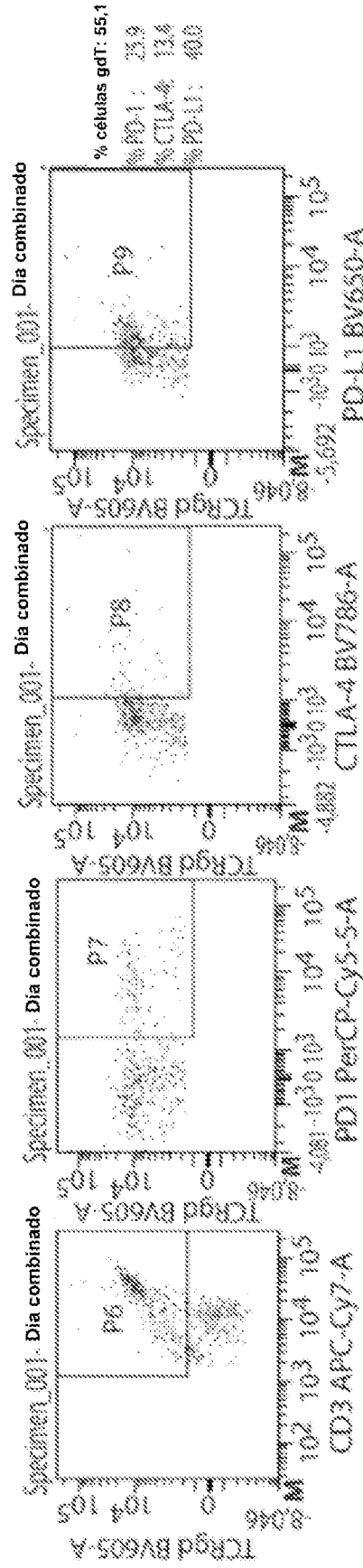
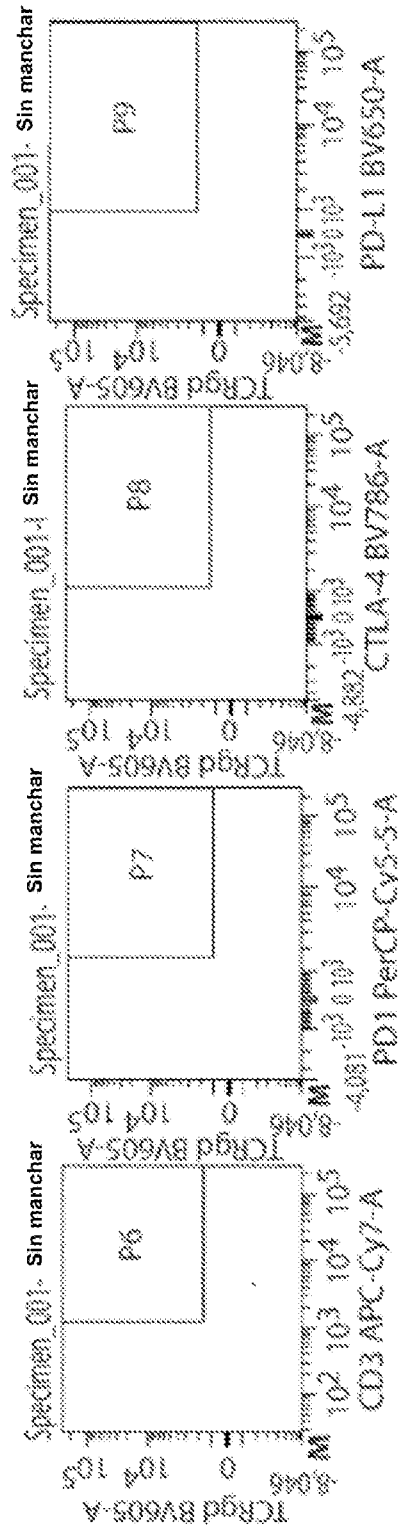


FIG. 4

Regulación superior de PD-1 y CTLA-4 en células T y humanas al estimularlas con IL2 y Zol

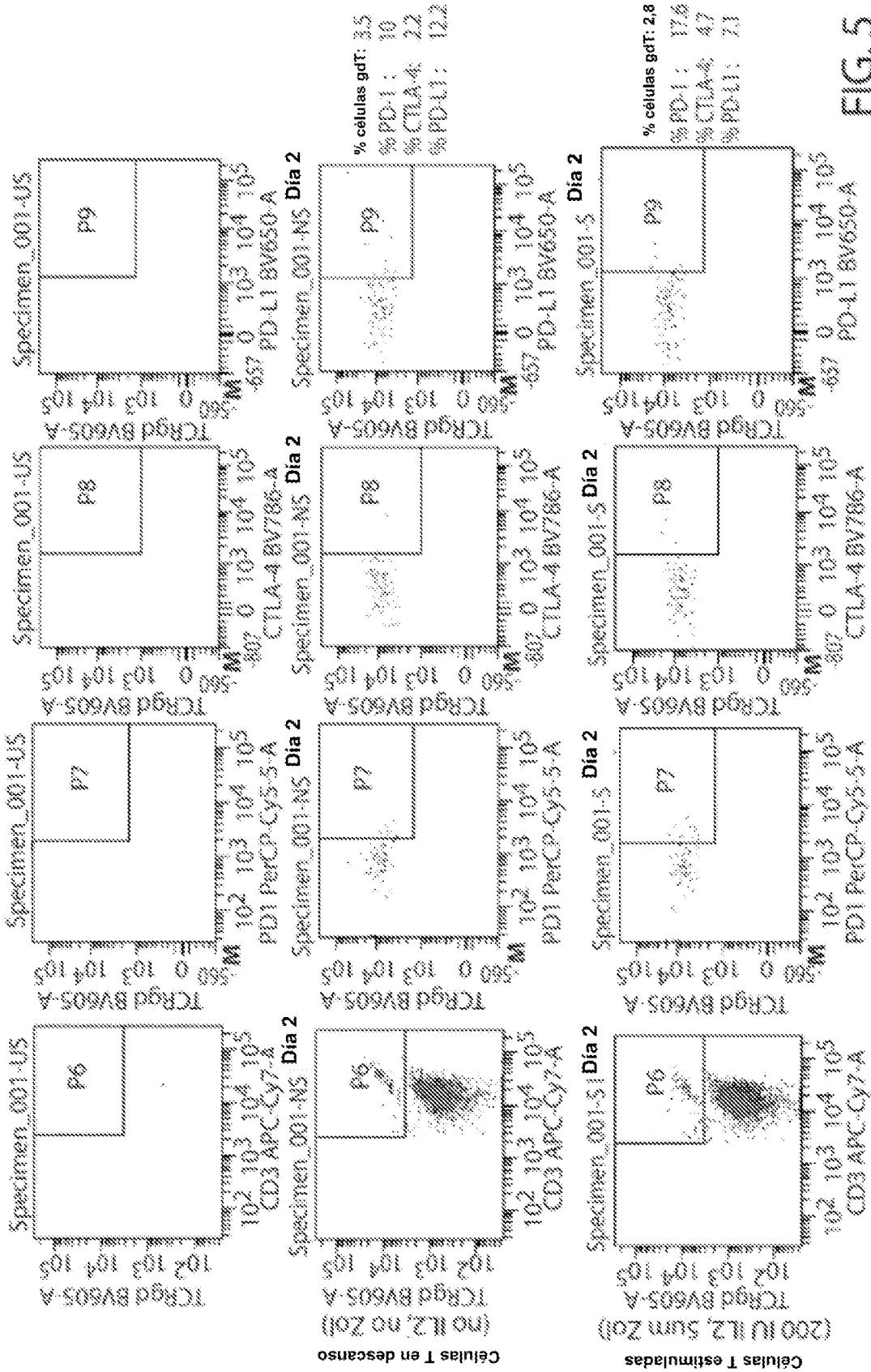


FIG. 5

Expresión de PD-L1 en células tumorales de glioblastoma

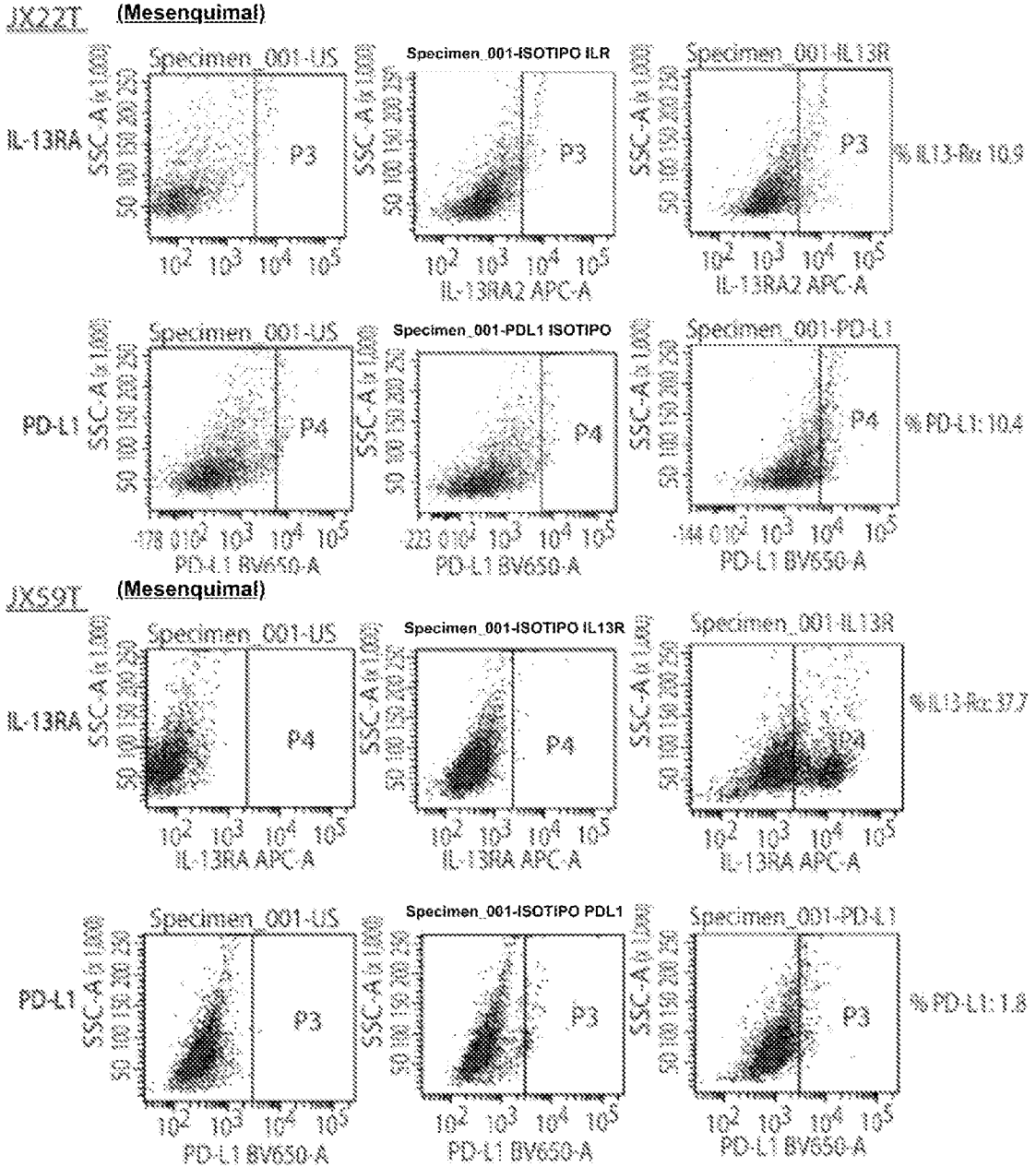


FIG. 6

JX12L (Clásico)

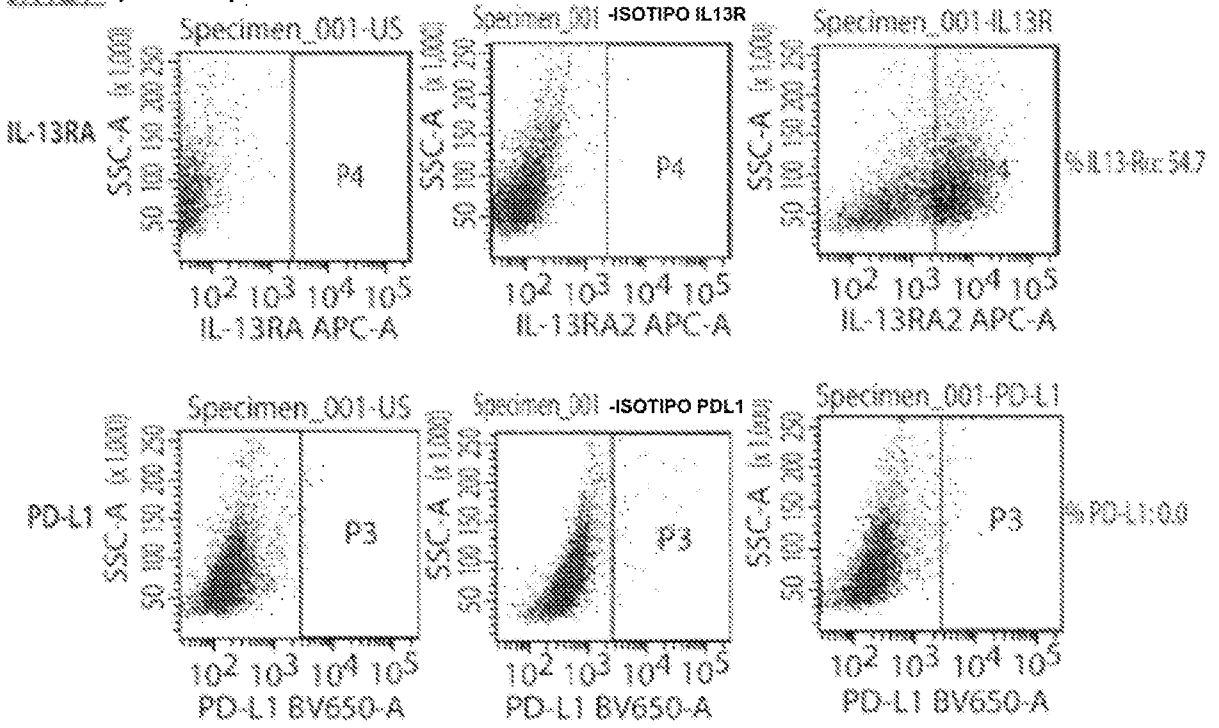


FIG. 6 (Continuada)

Citotoxicidad de células Tyδ fabricadas por GMP

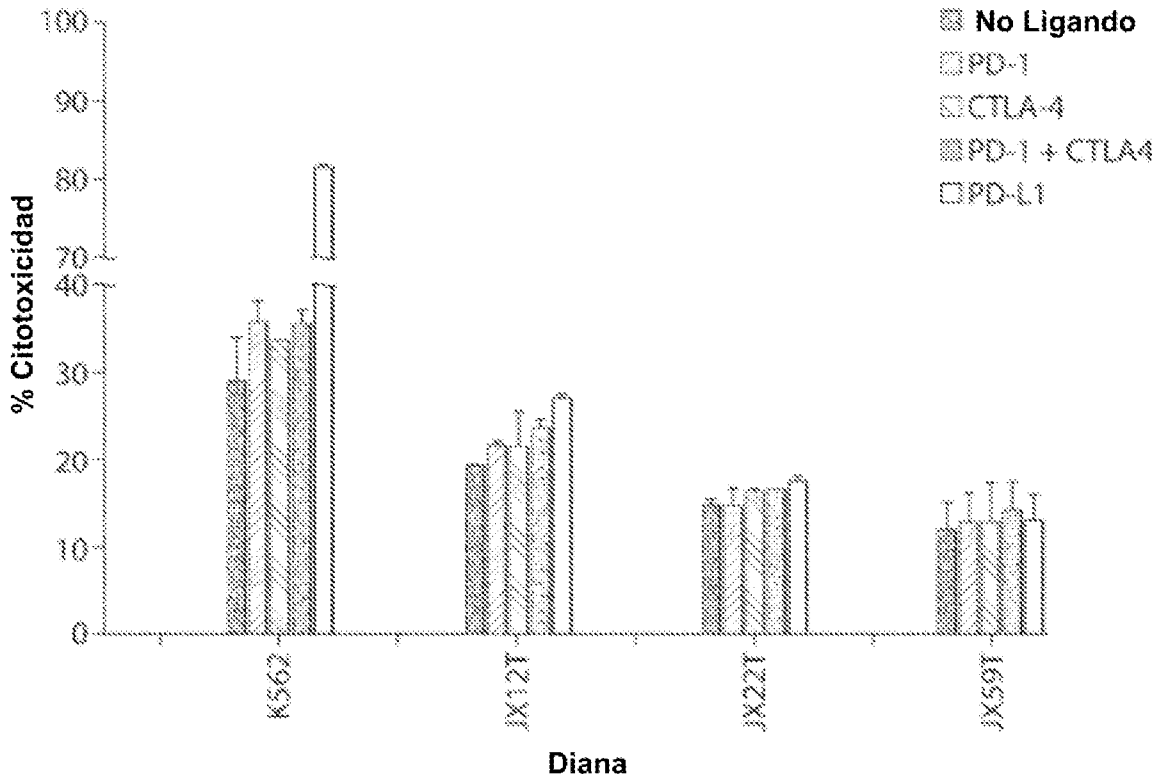


FIG. 7