

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 950 653**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

A61K 35/17 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2018** **PCT/EP2018/066690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2018** **WO18234516**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2018** **E 18735229 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2023** **EP 3642331**

54 Título: **Método de expansión de linfocitos T y usos**

30 Prioridad:

22.06.2017 GB 201710023

16.10.2017 GB 201716978

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2023

73 Titular/es:

NEOGAP THERAPEUTICS AB (100.0%)
c/o Center for Molecular Medicine Karolinska
sjukhuset L8:02
171 76 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

GRÖNLUND, HANS

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 950 653 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

Método de expansión de linfocitos T y usos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para la expansión de linfocitos T antitumorales de un sujeto con cáncer, y a composiciones y usos de linfocitos T antitumorales producidos según el método de la invención, en particular, en el tratamiento del cáncer.

10 Antecedentes de la invención

El sistema inmunitario adaptativo constituye la rama del sistema inmunitario que puede adaptarse y responder específicamente a diferentes patógenos o desafíos que dañan las células del organismo, frente al sistema inmunitario innato que responde de forma más genérica. El sistema adaptativo incluye tanto la inmunidad humoral, es decir, los anticuerpos secretados por los linfocitos B, como la inmunidad mediada por los linfocitos T. La especificidad del sistema inmunitario adaptativo reside en los receptores de linfocitos B y T expresados en los linfocitos B y T. Mediante un intrincado sistema de mezcla de segmentos genéticos, el organismo produce una variedad casi infinita de linfocitos B y T, cada uno de los cuales expresa un receptor específico para una determinada proteína o péptido.

Los linfocitos T son linfocitos que forman una parte importante del sistema inmunitario adaptativo, donde desempeñan un papel central en la inmunidad celular. El receptor definitorio de los linfocitos T (TCR) se expresa en la superficie celular, y cada receptor reconoce un péptido derivado de un antígeno presentado en el contexto de una molécula del MHC (por sus siglas en inglés, complejo mayor de histocompatibilidad). Existen varios tipos de linfocitos T, cada uno con una función distinta en la respuesta inmunitaria celular.

Existen dos tipos principales de linfocitos T con funciones diferentes. Los linfocitos T CD8 positivos citotóxicos se unirán a péptidos presentados sobre el receptor de MHC de clase I (en seres humanos, se denomina antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés) de clase I) en una célula. Todas las células nucleadas expresan HLA de clase I. Si el péptido presentado se considera extraño (lo más frecuente es que sea un signo de infección vírica), el linfocito T citotóxico eliminará a la célula mediante la proteína granzima B o perforina. Los linfocitos T colaboradores (Th), que expresan el marcador de superficie CD4, no matan, sino que orquestan respuestas inmunitarias mediante la secreción de citocinas, proteínas que aumentarán las señales proinflamatorias y a veces inhibitorias entre las células. Otra función importante de los linfocitos T colaboradores es inducir el cambio de clase de los linfocitos B, por ejemplo, para convertir un linfocito B secretor de IgM en una célula secretora de IgG, que aumentará la respuesta inmunitaria humoral contra un antígeno.

Un linfocito T colaborador se unirá mediante su TCR al péptido correspondiente presentado en el MHC-II (en humanos, denominado HLA de clase II), un receptor que se expresa específicamente en las denominadas células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) o las células endoteliales. La activación de los linfocitos T depende del microentorno en el que se produce la interacción Th-APC y del tipo de las denominadas moléculas coestimuladoras que se expresan en la APC. Los linfocitos T colaboradores pueden diferenciarse en diferentes subconjuntos Th, por ejemplo, linfocitos Th1, Th2, Th17 proinflamatorios o en un tipo de linfocito T colaborador inhibidor denominado linfocitos T reguladores (Treg). Este último subconjunto es de gran importancia para controlar las respuestas inmunitarias, ya que un sistema inmunitario descontrolado es perjudicial y puede provocar daños en los tejidos y autoinmunidad.

Se conocen estrategias inmunológicas para el tratamiento del cáncer. El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los puntos de control de la activación inmunitaria ha tenido mucho éxito, por ejemplo, en el tratamiento del melanoma, el cáncer de pulmón, el cáncer de vejiga y cánceres gastrointestinales. Aunque los distintos anticuerpos monoclonales tienen mecanismos de acción diferentes, todos ellos conducen a la activación y expansión de linfocitos T antitumorales (o "reactivos al tumor").

Dado que los linfocitos T suelen ser el efector final de los tratamientos contra el cáncer inmunomediados, se han desarrollado estrategias que utilizan directamente los linfocitos T antitumorales. Una estrategia es la transferencia celular adoptiva (ACT), en donde los linfocitos T se expanden fuera del cuerpo y se reinfunden en grandes cantidades en un sujeto con cáncer. Esta estrategia se analiza, por ejemplo, en Klebanoff *et al.*, Nature Medicine, 2016, 22, 26-36.

Ha habido algunos éxitos en este campo. Por ejemplo, se publicó un estudio en el que se trató a pacientes con cáncer de colon avanzado mediante un protocolo de inmunoterapia adoptiva en Karlsson *et al.*, Ann Surg Oncol., 2010, 17(7): 1747-57. El tratamiento se basó en el aislamiento y la expansión *in vitro* de linfocitos autólogos reactivos al tumor aislados intraoperatoriamente del primer ganglio linfático que drena de forma natural el tumor (el ganglio centinela). Se recogieron linfocitos adquiridos en el ganglio centinela, se activaron, se expandieron frente a extracto tumoral autólogo y se devolvieron en forma de transfusión. No se observaron efectos secundarios tóxicos ni otros efectos adversos. Se produjo una remisión total o marcada de la enfermedad en cuatro pacientes con metástasis hepáticas y

pulmonares y doce pacientes mostraron una remisión parcial o una enfermedad estable. Se observó que existía una correlación de respuesta dependiente de la dosis y que los pacientes en estadio IV mostraban una supervivencia significativamente mayor, de 2,6 años, en comparación con los pacientes de control, de 0,8 años. Se llegó a la conclusión de que era posible expandir los linfocitos recién aislados adquiridos del ganglio centinela y transfundirlos de forma segura al paciente sin complicaciones.

Sin embargo, obtener suficientes linfocitos T antitumorales para su uso en la transferencia de células adaptativas utilizando los métodos actuales es todo un reto: es necesaria la extirpación quirúrgica de un cáncer para obtener linfocitos infiltrantes del tumor que se van a expandir. Se trata de un procedimiento invasivo. Además, las células obtenidas son escasas y con frecuencia no responden (son anérgicas) debido a los mecanismos inmunosupresores del tumor. Esto puede dar lugar a que sean necesarios largos periodos para obtener una expansión suficiente (varios meses).

Se han desarrollado linfocitos T modificados genéticamente para superar los aspectos prácticos que limitan el uso de la transferencia celular adoptiva mediante linfocitos infiltrantes de tumores. Los linfocitos T modificados genéticamente pueden obtenerse redirigiendo genéticamente la especificidad de un linfocito T hacia el cáncer de un paciente mediante la introducción de receptores de antígeno o introduciendo en un linfocito T una estructura sintética de reconocimiento denominada "receptor de antígeno quimérico". Aunque los linfocitos T modificados genéticamente han tenido éxito en el tratamiento de cánceres hematológicos, la seguridad y selectividad de los linfocitos T modificados genéticamente para el tratamiento de cánceres sólidos requiere mejoras. El documento WO 2016/053339 (Estados Unidos de América, representado por el Secretario del Departamento de Salud y Servicios Humanos) divulga un método de aislamiento de linfocitos T que tienen especificidad antigénica para una secuencia mutada de aminoácidos codificada por una mutación específica del cáncer, comprendiendo el método: identificar uno o más genes en el ácido nucleico de una célula cancerosa de un paciente, conteniendo cada gen una mutación específica del cáncer que codifique una secuencia de aminoácidos mutada; inducir a las APC autólogas del paciente para presentar la secuencia de aminoácidos mutada; cocultivar los linfocitos T autólogos del paciente con las APC autólogas que presentan la secuencia de aminoácidos mutada; y seleccionar los linfocitos T autólogos. El paso de selección requiere seleccionar los linfocitos T autólogos que (a) se cocultivaron con las APC autólogas que presentan la secuencia de aminoácidos mutada y (b) tienen especificidad antigénica para la secuencia de aminoácidos mutada presentada en el contexto de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresada por el paciente para proporcionar linfocitos T aislados que tienen especificidad antigénica para la secuencia de aminoácidos mutada codificada por la mutación específica del cáncer. Se divulga que una vez seleccionadas esas células, se expanden cultivándolas con PBMC alimentadoras (por ejemplo, PBMC alogénicas irradiadas), interleucina (IL)-2, y anticuerpo OKT3.

Para inducir a las APC autólogas del paciente para que presenten la secuencia de aminoácidos mutada, el documento WO2016/053339 enseña a utilizar la pulsación con construcciones de péptidos o nucleótidos libres para introducir el neoantígeno (o el material codificante del neoantígeno) en una célula. La pulsación con péptido libre introduce el neoantígeno en el citosol (líquido intracelular) de la célula.

El documento EP3182125 se refiere al campo de los métodos de diagnóstico y análisis que implican la determinación de la activación de linfocitos T específicos de antígeno.

Por lo tanto, sigue habiendo necesidad de métodos mejorados para proporcionar linfocitos T antitumorales adecuados para su uso en el tratamiento de cánceres, con buena seguridad y selectividad, y que puedan utilizarse en la práctica en un entorno clínico.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para la expansión de linfocitos T antitumorales de un sujeto con cáncer, y una composición que comprende linfocitos T antitumorales de un sujeto con cáncer, como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que las partículas fagocitables con construcciones neoantigénicas tumorales fuertemente asociadas a ellas pueden internalizarse por las células presentadoras de antígenos, y que las construcciones neoantigénicas tumorales pueden presentarse en la superficie de esas células y provocar la expansión de los linfocitos T cultivados en presencia de la mezcla de partículas/APC. El uso de las partículas fagocitables conduce a una captación y un procesamiento sorprendentemente elevados de las construcciones neoantigénicas tumorales.

Mediante el uso de una partícula fagocitable, que tiene una o más construcciones neoantigénicas estrechamente asociadas con la misma, en combinación con células presentadoras de antígeno, y exponiendo la partícula/células presentadoras de antígenos a una muestra de linfocitos T de un sujeto con cáncer, se puede lograr un alto nivel de expansión de los linfocitos T antitumorales. En general, se utiliza una pluralidad de partículas, por ejemplo, de 100 a 1×10^7 partículas (que pueden ser todas de la misma especie o que pueden ser diferentes, como se describe con más detalle más adelante).

El método es especialmente eficaz ya que permite controlar la secuencia de la construcción neoantigénica tumoral, y también permite incluir más de una construcción neoantigénica tumoral en una partícula. Por ejemplo, se pueden unir a una partícula diferentes construcciones neoantigénicas tumorales que comprendan uno o más epítopos neoantigénicos diferentes. Esta capacidad de multiplexado de las partículas permite la estimulación con múltiples epítopos para maximizar la expansión de los linfocitos T.

El uso de una partícula fagocitable también permite que una gran cantidad de construcción neoantigénica tumoral entre en la célula y se presente en la superficie celular. Una sola partícula fagocitable suele tener asociadas de 0,5 a 1 millón de construcciones neoantigénicas tumorales. Esto conduce a altos niveles de expresión superficial del neoantígeno en las APC que han internalizado una partícula fagocitable.

El uso de una partícula fagocitable también permite, sorprendentemente, que las construcciones neoantigénicas tumorales se presenten a las células presentadoras de antígenos en una forma altamente estéril y pura. Por ejemplo, las partículas fagocitables son especialmente eficaces para permitir la eliminación de contaminantes, como los pirógenos.

Sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, se cree que las partículas fagocitables que tienen construcciones neoantigénicas tumorales fuertemente asociadas son especialmente eficaces porque se internalizan por las células presentadoras de antígenos mediante fagocitosis en un fagosoma. A continuación, las construcciones neoantigénicas tumorales se escinden de las partículas en el fagosoma y los fragmentos de la construcción neoantigénica tumoral se presentan en la superficie de las células presentadoras de antígenos a través de la vía de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase II y se presentan en la superficie celular mediante una molécula de MHC de clase II. También se cree que éste no es el proceso exclusivo para que el antígeno se presente en las APC, y que algunos fragmentos de la construcción neoantigénica tumoral también pueden presentarse en la superficie de las células presentadoras de antígenos a través de la vía de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I y presentarse en la superficie celular por una molécula de MHC de clase I, en un proceso conocido como presentación cruzada. Por lo tanto, aunque se espera que los fragmentos de la construcción neoantigénica tumoral se presenten en las APC predominantemente a través de la vía del MHC de clase II, se espera que algunas se presenten a través de la vía del MHC de clase I, por lo que el método de la presente invención aprovecha ambas vías en distinta medida.

Cuando los antígenos se presentan por una molécula de MHC de clase II, generalmente activan los linfocitos T colaboradores (también conocidos como linfocitos T CD4+), que no matan directamente a otros tipos de células, sino que orquestan las respuestas inmunitarias mediante la secreción de citocinas, induciendo el cambio de clase de los linfocitos B para ayudarles a fabricar anticuerpos y estimular la expansión de otros tipos de linfocitos T. Esto significa que la población de linfocitos T activados y expandidos según el método de la presente invención, cuando se administra a un paciente, tiene la ventaja de que la respuesta inmunitaria se inicia lentamente (lo que provoca pocos efectos secundarios), tiene un efecto duradero y puede atacar a los cánceres de muchas maneras diferentes, aprovechando todo el sistema inmunitario (por ejemplo, en lugar de activar únicamente los linfocitos T CD8 positivos citotóxicos, que solo pueden atacar directamente a las células tumorales). Esto contrasta con lo que se esperaría que ocurriera cuando un antígeno se proporciona como péptido libre o como una construcción de nucleótidos que expresa el péptido. Se espera que un antígeno de este tipo sea absorbido por el citosol de una APC, lo que da lugar a que el neoantígeno se presente en la superficie celular únicamente a través de la vía del MHC de clase I por una molécula del MHC de clase I. Esto, a su vez, resulta predominantemente en la activación de linfocitos T CD8 positivos citotóxicos.

Cuando la composición de la presente invención se utiliza para el tratamiento del cáncer, se aprovecha y estimula el propio sistema inmunitario del paciente. Esto significa que no es necesario reducir los linfocitos T endógenos inducidos por la quimioterapia antes de administrar los linfocitos T. Así pues, el método tiene menos efectos secundarios que otros métodos alternativos comparables.

Además, después del direccionamiento inicial, los linfocitos T de memoria procedentes de linfocitos T colaboradores permanecen en circulación y pueden organizar una respuesta inmunitaria secundaria rápida y eficaz mientras las células cancerosas que expresan el neoantígeno permanezcan en el organismo, o si el mismo cáncer reaparece.

Por lo tanto, una población de linfocitos T expandidos según el método de la presente invención, cuando se expande y se administra a un paciente, seguirá funcionando incluso después de que los linfocitos T originales administrados hayan muerto, debido a los linfocitos T de memoria derivados de los linfocitos T activados originalmente.

El método de la invención también permite que los linfocitos T expandidos se generen muy rápidamente, ya que la partícula fagocitable con una o más construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas a ella puede prepararse rápidamente de forma estéril y pura, y la expansión puede entonces iniciarse y completarse rápidamente. Esto es importante, ya que el éxito de la terapia depende de que el cáncer en el sujeto sea esencialmente el mismo cuando se administran los linfocitos T que cuando se tomó la muestra del sujeto.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efecto del tamaño de las partículas en la activación de los linfocitos T. Ensayo de proliferación (con

incorporación de timidina) con esplenocitos de ratones sensibilizados a la ovoalbúmina. Comparación de la ovoalbúmina acoplada a partículas de diferentes tamaños con un diámetro de 5,6 µm, 1 µm y 0,2 µm. Los valores de p se determinaron mediante la prueba de la T de Student y se indicaron cuando se observó un valor de $p < 0,05$. Los corchetes indican la DE.

Figura 2. Expansión de linfocitos T mediante estimulación con péptidos neoantigénicos NA1-9. La Figura 2A muestra el número de células en el cultivo con el paso del tiempo. La Figura 2B muestra el % de linfocitos T CD4+/totales.

La figura 2C muestra la expresión de T-bet en CD4. La Figura 2D muestra la expresión de granzima B y perforina en linfocitos T CD8+.

Figura 3. Expansión de linfocitos T mediante estimulación con una construcción neoantigénica. Se muestra el porcentaje entre linfocitos T (cuadrados pequeños) y número total (cuadrados grandes) de linfocitos T CD4+, así como de células CD4+ en proliferación (círculos).

Figura 4. Expansión de linfocitos T mediante estimulación con una construcción neoantigénica. La figura 4A muestra el número de células en el cultivo a lo largo del tiempo (línea roja: péptido personalizado; líneas rosa y naranja: péptidos predichos en cultivos de control con la misma proteína, pero con las mutaciones predichas (NA1, 3, 4 y 5)). La Figura 4B muestra el % de linfocitos T CD4+/totales. La Figura 4C visualiza el análisis realizado con el algoritmo de inclusión de vecinos estocásticos de Barnes-Hut (BH-SNE, por sus siglas en inglés) para linfocitos T CD4, donde todas las células de las muestras se agrupan en un mapa en 2 dimensiones en función de la similitud en la intensidad de expresión según un conjunto de marcadores seleccionados: CD28, CD57, T-bet, GATA-3, perforina, granzima B (GZB), Ki-67 y PD-1.

Figura 5A. Imágenes por microscopía confocal de PBMC con partículas acopladas a antígeno fagocitado intracelular de tres tamaños (4,5 µm, 2,8 µm o 1 µm) después de la incubación durante 18 h a 37 °C con las partículas acopladas a antígeno.

Figura 5B. Gráfica que muestra la captación de partículas acopladas a antígeno de dos tamaños (4,5 µm o 2,8 µm) en PBMC tras incubación durante 18 h a 37 °C, evaluada mediante recuento manual.

Figura 5C. Gráfica que muestra la captación de partículas acopladas a antígeno de tres tamaños (4,5 µm, 2,8 µm o 1 µm) en PBMC tras incubación durante 18 h a 37 °C, evaluada mediante el cálculo del volumen (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, calculados usando la prueba de la T de Student).

Figura 6A. Gráfica que muestra el aumento relativo del nivel de producción de IFN γ en PBMC de donantes sanos sensibles al CMV (n = 2) estimuladas con las partículas acopladas al antígeno de tres tamaños (4,5 µm, 2,8 µm o 1 µm) en comparación con las células no estimuladas, como se evaluó en el ensayo FluoroSpot del Ejemplo 3a(iv).

Figura 6B. Gráfica que muestra el aumento relativo del nivel de producción de IL22 en PBMC de un donante sano sensible al CMV (n = 1) estimuladas con las partículas acopladas al antígeno de tres tamaños (4,5 µm, 2,8 µm o 1 µm) en comparación con las células no estimuladas, como se evaluó en el ensayo FluoroSpot del Ejemplo 3a(iv).

Figura 6C. Gráfica que muestra el aumento relativo del nivel de producción de IL17 en PBMC de un donante sano sensible al CMV (n = 1) estimuladas con las partículas acopladas al antígeno de tres tamaños (4,5 µm, 2,8 µm o 1 µm) en comparación con las células no estimuladas, como se evaluó en el ensayo FluoroSpot del Ejemplo 3a(iv).

Figura 6D. Gráfica que muestra el aumento relativo de la producción dual de citocinas de IFN γ e IL17 en PBMC de un donante sano sensible al CMV (n = 1) estimuladas con las partículas acopladas al antígeno de tres tamaños (4,5 µm, 2,8 µm o 1 µm) en comparación con las células no estimuladas, como se evaluó en el ensayo FluoroSpot del Ejemplo 3a(iv).

Figura 6E. Gráfica que muestra el aumento relativo de la producción dual de citocinas de IL22 e IL17 en PBMC de un donante sano sensible al CMV (n = 1) estimuladas con las partículas acopladas al antígeno de tres tamaños (4,5 µm, 2,8 µm o 1 µm) en comparación con las células no estimuladas, como se evaluó en el ensayo FluoroSpot del Ejemplo 3a(iv).

Definiciones

Las *endotoxinas*, por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS), comprenden subunidades de lípidos y polisacáridos unidas covalentemente que se encuentran en la pared celular externa de las bacterias gramnegativas, tales como *Escherichia coli*.

Los *linfocitos T CD4+* (o linfocitos T colaboradores o linfocitos T colaboradores CD4+) son células que orquestan las respuestas inmunitarias mediante la secreción de citocinas. Ambas pueden suprimir o potenciar otras células

inmunitarias, como estimular el cambio de clase de anticuerpos de los linfocitos B, la expansión de linfocitos T citotóxicos o potenciar los fagocitos. Se activan mediante la presentación de antígenos a través del MHC de clase II en las APC y expresan un receptor de linfocitos T (TCR) específico para un tramo de aproximadamente 15 aminoácidos (el denominado epítipo de linfocitos T) dentro de un antígeno concreto.

Los linfocitos T CD8+ (o linfocitos T citotóxicos) son células que destruyen las células tumorales, células infectadas o dañadas de otro modo. A diferencia de los linfocitos T CD4+, no necesitan APC para activarse. Su receptor de linfocitos T reconoce péptidos derivados de antígenos (de aproximadamente 7-10, por ejemplo, 8, aminoácidos de longitud) presentados por el MHC de clase I, una proteína que se expresa en todas las células nucleadas.

La activación de linfocitos T específicos de antígeno es un proceso que requiere la interacción entre el TCR y un péptido definido presentado en una molécula del MHC (HLA) en combinación con la coestimulación.

Las células presentadoras de antígenos (APC) suelen ser células dendríticas (DC), linfocitos B o macrófagos, células que fagocitan o internalizan organismos extracelulares o proteínas, es decir, antígenos, y tras su procesamiento, presentan los péptidos derivados del antígeno en el MHC de clase II a los linfocitos T CD4+. En la sangre, los monocitos son las células presentadoras de antígenos más abundantes.

Una partícula fagocitable se define como una partícula capaz de ser fagocitada por células del sistema inmunitario, en particular monocitos.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), son una fracción de sangre humana preparada por centrifugación en gradiente de densidad de sangre completa. La fracción de PBMC está compuesta principalmente por linfocitos (70-90 %) y monocitos (10-30 %), mientras que se eliminan los glóbulos rojos, los granulocitos y el plasma. En algunos casos, los monocitos pueden constituir entre el 10 y el 20 % del número de células de una muestra de PBMC, por ejemplo del 10 al 15 %.

Un neoantígeno tumoral es un cambio inducido por el tumor en la secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína que puede ser reconocido por el sistema inmunitario como material extraño.

Una secuencia de aminoácidos que comprende un aminoácido mutado es una secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína en una célula tumoral de un sujeto con una alteración en comparación con la secuencia en una célula no tumoral de un sujeto. El aminoácido mutado puede ser una mutación puntual: por ejemplo, la inserción o supresión de un aminoácido, o la sustitución de un aminoácido por otro diferente en una secuencia de proteína o péptido. En algunas circunstancias, puede haber dos o más aminoácidos mutados seguidos. Una mutación puede ser una mutación de cambio de marco.

Descripción detallada

La presente invención proporciona métodos para la expansión de linfocitos T antitumorales, y composiciones y usos de los linfocitos T antitumorales producidos según el método de la invención, como se divulga con más detalle a continuación.

La partícula fagocitable y sus propiedades:

La partícula es fagocitable por una célula presentadora de antígenos (APC). Las APC pueden fagocitar partículas de muy diversos materiales y formas. Por tanto, es necesario seleccionar el tamaño de las partículas para que sea posible la fagocitosis. Una partícula de tamaño demasiado pequeño puede no desencadenar la fagocitosis por una APC determinada. Una partícula de tamaño demasiado grande puede no ser fagocitable por un APC concreta, ya que puede no caber en la célula.

Preferentemente, las partículas para su uso en un método de la invención pueden tener una dimensión mayor de menos de 5,6 µm, preferentemente de menos de 4 µm, más preferentemente de menos de 3 µm, por ejemplo, de menos de 2,5 µm, de menos de 2 µm o de menos de 1,5 µm. Preferentemente, las partículas para su uso en un método de la invención pueden tener una dimensión mayor de más de 0,001 µm, preferentemente de más de 0,005 µm, preferentemente de más de 0,01 µm, preferentemente de más de 0,05 µm, preferentemente de más de 0,1 µm, más preferentemente de más de 0,2 µm y aún más preferentemente de más de 0,5 µm. Preferentemente, las partículas tienen una dimensión mayor en el intervalo de 0,1-5,6 µm, preferentemente de 0,2-5,6 µm, preferentemente de 0,5-5,6 µm, preferentemente de 0,1-4 µm, preferentemente de 0,5-4 µm, más preferentemente de 0,1-3 µm, más preferentemente de 0,5-3 µm, incluso más preferentemente de 0,1-2,5 µm, incluso más preferentemente de 0,5-2,5 µm, incluso más preferentemente de 0,2-2 µm, incluso más preferentemente de 0,5-2 µm, más preferentemente de 1-2 µm o por ejemplo, de aproximadamente 1 µm, aproximadamente 1,5 µm o aproximadamente 2 µm (preferentemente aproximadamente 1 µm). Las partículas pueden ser sustancialmente esféricas, en cuyo caso las dimensiones se referirán al diámetro. Preferentemente, las partículas son sustancialmente esféricas.

Los tamaños de partícula preferidos son los suficientemente grandes para entrar en una célula por fagocitosis, pero lo

suficientemente pequeñas como para que más de una partícula pueda entrar en la misma célula por fagocitosis. Tener más de una partícula fagocitada significa que la APC puede tomar péptidos de varias partículas en diferentes fagosomas al mismo tiempo, y así maximizará la expresión del neoantígeno en la superficie celular a través de la vía del MHC de clase II.

En general, un tamaño similar al de las bacterias facilita la fagocitosis completa por parte de las APC. La fagocitosis completa conduce a una buena degradación del antígeno por las APC y, posteriormente, a una buena presentación a los linfocitos T a través del MHC de clase II. Los presentes inventores han investigado el tamaño óptimo (véanse los Ejemplos 3a y 3b, y las Figuras 1, 5A-C, y 6A-E).

Las partículas tienen propiedades paramagnéticas, por ejemplo, propiedades superparamagnéticas. Una partícula paramagnética o superparamagnética puede separarse completamente de los linfocitos T mediante el uso de un imán. De manera importante, las APC que contienen una partícula internalizada también pueden separarse de los linfocitos T mediante el uso de un imán. Esto permite aislar rápidamente los linfocitos T de la mezcla de incubación. A continuación, los linfocitos T pueden administrarse a los pacientes sabiendo que se han eliminado todas las partículas. La invención proporciona así un método especialmente seguro de expansión de linfocitos T.

Una partícula paramagnética también facilita la esterilización y/o desnaturalización de las partículas con la construcción neoantigénica tumoral asociada a ella. Los lavados se analizan con más detalle a continuación. Durante un lavado, las partículas pueden recogerse y/o retenerse con un imán. También es posible realizar un lavado por otros medios, por ejemplo, manteniendo las partículas (paramagnéticas o no) en una columna, o sedimentando las partículas por gravedad o por centrifugación.

Un ejemplo de partícula superparamagnética son las Dynabeads™ (Invitrogen). Están disponibles en varias formas funcionalizables, por ejemplo, Dynabeads M-270 Carboxylic acid, Dynabeads M-270 Amine y Dynabeads MyOne Carboxylic acid. Las Dynabeads MyOne Carboxylic Acid son partículas superparamagnéticas uniformes de un solo tamaño, que están compuestas de poliestireno altamente reticulado con material magnético distribuido uniformemente. Las partículas se recubren además con una capa hidrófila de éter glicídico, ocultando el óxido de hierro en su interior. A continuación, se introducen grupos de ácido carboxílico en la superficie de las partículas.

Otros ejemplos de partículas superparamagnéticas son las microesferas Estapor® SuperParamagnetic carboxiladas encapsuladas (Merck Chimie S.A.S.) y las partículas magnéticas modificadas con carboxilato (hidrófilas) Sera-Mag SpeedBeads (GE Healthcare UK Limited). Las microesferas carboxiladas encapsuladas Estapor® SuperParamagnetic están formadas por una estructura de núcleo-cubierta. El material de óxido de hierro superparamagnético (~40 %) está encapsulado por una película de poliestireno y no interfiere con los componentes de la superficie. Las partículas magnéticas modificadas con carboxilato Sera-Mag SpeedBeads (hidrófilas) son partículas magnéticas de tamaño uniforme y presentan una segunda capa de magnetita (en total dos capas que constituyen ~60 %).

Como resultado, las Sera-Mag Speed Beads responden muy rápidamente a un campo magnético para separarse rápida y completamente de las suspensiones. Tienen una superficie parecida a la coliflor, lo que aumenta la superficie total y la capacidad de unión de las partículas.

Asociación del polipéptido antigénico y la partícula

La construcción neoantigénica tumoral se asocia a la partícula de forma que permite realizar un lavado de esterilización y desnaturalización, como se expone más adelante, sin disociar la construcción neoantigénica tumoral de la partícula.

Una forma de asociar el polipéptido a la partícula se muestra en el Ejemplo 1. Sin embargo, la forma precisa de asociación no es crítica para los métodos de la invención. Preferentemente, el polipéptido está unido covalentemente a la partícula (por ejemplo, mediante un enlace de amida entre un grupo amina o un grupo ácido carboxílico del polipéptido y un grupo ácido carboxílico o un grupo amina de la superficie de la partícula). Como alternativa, el polipéptido candidato a antígeno puede estar unido a las partículas mediante un quelato metálico. Por ejemplo, las partículas unidas con un ligando quelante metálico, tal como el ácido iminodiacético pueden unir iones metálicos como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} o Fe^{3+} . A su vez, estos quelatos metálicos pueden unirse con gran fuerza a proteínas y péptidos que contengan, por ejemplo, histidina o cisteína. Por lo tanto, las partículas con quelatos metálicos pueden adsorber péptidos/proteínas de forma no covalente, de forma que permita un lavado riguroso para reducir la cantidad de LPS y otros componentes contaminantes en los péptidos/proteínas unidos.

La partícula puede comprender polímero, vidrio o material cerámico (por ejemplo, la partícula puede ser una partícula polimérica, una partícula de vidrio o una partícula de cerámica). Preferentemente, la partícula comprende un polímero aromático sintético, tal como poliestireno u otro polímero, tal como polietileno. La partícula puede comprender un polímero polisacárido, por ejemplo agarosa. Preferentemente, la partícula no comprende un polímero de polisacárido (y preferentemente no es una partícula de polímero de polisacárido o una partícula basada en carbohidratos). Preferentemente, la partícula es una partícula de poliestireno o polietileno, y más preferentemente es una partícula de poliestireno. Preferentemente, la partícula es una partícula monodispersa (es decir, una partícula con un tamaño uniforme).

Construcción neoantigénica tumoral

Una construcción neoantigénica tumoral es un polipéptido que comprende más de un neoantígeno tumoral y/o al menos una secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa de un sujeto. La construcción neoantigénica tumoral puede comprender uno o más péptidos unidos covalentemente, en donde uno o más de los péptidos enlazados covalentemente comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto. En determinadas realizaciones del método de la invención, uno o más de los péptidos enlazados covalentemente comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa de un sujeto. La secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa de un sujeto puede ser una secuencia de aminoácidos que se sabe o se sospecha que se expresa en el tejido u órgano en el que está presente el tumor. La secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto (o que comprende una secuencia de aminoácidos mutada que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa en un sujeto) también puede denominarse "epítipo neoantigénico".

Preferentemente, el aminoácido mutado es un aminoácido sustituido (es decir, se sustituye un aminoácido en una proteína o péptido en una célula no tumoral por un aminoácido diferente en una célula tumoral). Como alternativa, el aminoácido mutado puede ser un aminoácido suprimido de la secuencia (es decir, suprimido en la proteína/péptido en la célula tumoral en comparación con la célula no tumoral); o el aminoácido mutado puede ser un aminoácido que se ha insertado en la secuencia (es decir, se ha añadido un nuevo aminoácido a la proteína/péptido en la célula tumoral en comparación con la célula no tumoral).

Un epítipo neoantigénico de la construcción neoantigénica tumoral puede diseñarse seleccionando una proteína/péptido mutado (o gen mutado) que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto; localizando el aminoácido o aminoácidos mutados en la secuencia de la proteína o péptido (o en la proteína/péptido que resultaría de la expresión del gen); y seleccionando la parte de la proteína/péptido que comprende el aminoácido o aminoácidos mutados, más una serie de aminoácidos flanqueantes al extremo carboxiloterminar y al extremo aminoterminar del aminoácido o aminoácidos mutados. En determinadas realizaciones preferidas del método de la invención, existe un único aminoácido mutado en la secuencia de la proteína o el péptido en comparación con la secuencia de la proteína o el péptido en una célula no tumoral. Más preferentemente, hay un único aminoácido mutado sustituido en la secuencia de la proteína o el péptido en comparación con la secuencia de la proteína o el péptido en una célula no tumoral.

Preferentemente, el número de aminoácidos flanqueantes al extremo carboxiloterminar del aminoácido o aminoácidos mutados es de al menos 5, preferentemente al menos 8, por ejemplo 8, 9, 10, 11 o 12 aminoácidos. Preferentemente, el número de aminoácidos flanqueantes al extremo aminoterminar del aminoácido o aminoácidos mutados es de al menos 5, preferentemente al menos 8, por ejemplo, 8, 9, 10, 11 o 12 aminoácidos. El número de aminoácidos que flanquean el extremo carboxiloterminar y el extremo aminoterminar del aminoácido o aminoácidos mutados puede ser el mismo o puede ser diferente, preferentemente el número es el mismo.

En determinadas realizaciones del método de la invención, uno o más de los péptidos enlazados covalentemente comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa de un sujeto. La secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa de un sujeto puede ser una secuencia de aminoácidos que se sabe o se sospecha que se expresa en el tejido u órgano en el que está presente el tumor.

En realizaciones del método de la invención en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende dos o más péptidos unidos covalentemente, preferentemente, cada péptido unido covalentemente comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto (es decir, un epítipo neoantigénico). Como alternativa, en realizaciones del método de la invención en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende dos o más péptidos unidos covalentemente, preferentemente, la construcción neoantigénica tumoral comprende al menos un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto (es decir, un epítipo neoantigénico), y al menos un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa en un sujeto.

En realizaciones del método de la invención en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende dos o más péptidos unidos covalentemente, los péptidos pueden estar unidos directamente o a través de un resto espaciador. El resto espaciador puede ser una secuencia corta de aminoácidos, por ejemplo de 1 a 15 aminoácidos, preferentemente, de 1 a 10 aminoácidos y más preferentemente, de 1 a 5 aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos). Preferentemente, el resto espaciador comprende el motivo VVR. En una realización del método de la invención el resto espaciador tiene la secuencia VVR. En una alternativa del método de la invención, el resto espaciador no incluye

el motivo VVR, por ejemplo, el resto espaciador no tiene la secuencia VVR. En otra realización del método de la invención, el resto espaciador comprende el motivo GGS, por ejemplo, el resto espaciador tiene la secuencia GGS. En otra realización del método de la invención, los péptidos están directamente unidos (es decir, no hay resto espaciador), por ejemplo, sin resto espaciador de aminoácidos).

5 En realizaciones preferidas del método de la invención, la construcción neoantigénica tumoral comprende dos o más péptidos enlazados covalentemente, y más preferentemente tres o más péptidos enlazados covalentemente (por ejemplo tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez péptidos unidos covalentemente, preferentemente tres, cuatro, cinco o seis péptidos unidos covalentemente, y más preferentemente tres, cuatro o cinco péptidos unidos
10 covalentemente). Preferentemente, cada uno de los péptidos enlazados está unido a través de un resto espaciador. Cada resto enlazador puede ser igual o puede ser diferente. Se ha descubierto que tres péptidos enlazados covalentemente, comprendiendo cada uno una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto, es especialmente eficaz.

15 La estructura de la construcción neoantigénica tumoral que comprende dos péptidos enlazados puede ser la siguiente:

- [secuencia epitópica 1] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 2].

20 La estructura de la construcción neoantigénica tumoral que comprende tres péptidos enlazados puede ser la siguiente:

- [secuencia epitópica 1] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 2] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 3].

La estructura de la construcción neoantigénica tumoral que comprende cuatro péptidos enlazados puede ser la siguiente:

25 - [secuencia epitópica 1] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 2] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 3] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 4].

30 La estructura de la construcción neoantigénica tumoral que comprende cinco péptidos enlazados puede ser la siguiente:

- [secuencia epitópica 1] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 2] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 3] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 5].

35 La estructura de la construcción neoantigénica tumoral que comprende n péptidos enlazados puede ser la siguiente:

- [secuencia epitópica 1] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 2] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica 3] - [resto enlazador] - [secuencia epitópica n].

40 En realizaciones preferidas del método de la invención, cada péptido de la construcción neoantigénica tumoral comprende de 5 a 50 aminoácidos, más preferentemente, de 5 a 30 aminoácidos, más preferentemente, de 8 a 30 aminoácidos y lo más preferentemente de 10 a 25 aminoácidos, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos. En una realización especialmente preferida del método de la invención, cada péptido de la construcción neoantigénica tumoral comprende de 17 a 25 aminoácidos, por ejemplo, comprende el aminoácido
45 mutado más de 8 a 12 aminoácidos (preferentemente 10 aminoácidos) hasta el extremo carboxiloterminale y el extremo aminoterminale del aminoácido mutado.

En realizaciones del método de la invención en donde la partícula está asociada con dos o más construcciones neoantigénicas tumorales, cada construcción neoantigénica tumoral puede tener la misma secuencia polipeptídica o
50 puede tener secuencias polipeptídicas diferentes. Por ejemplo, una primera construcción neoantigénica tumoral puede comprender uno o más péptidos unidos covalentemente (por ejemplo, uno o más epítopos neoantigénicos), y una segunda construcción neoantigénica tumoral puede comprender uno o más péptidos diferentes unidos covalentemente (por ejemplo, uno o más epítopos neoantigénicos diferentes al epítipo o epítopos neoantigénicos de la primera construcción neoantigénica tumoral).

55 Una construcción neoantigénica tumoral puede comprender al menos 20 aminoácidos, más preferentemente, al menos 30 aminoácidos, más preferentemente, al menos 40 aminoácidos, más preferentemente, al menos 50 aminoácidos, incluso más preferentemente, al menos 60 aminoácidos. Una construcción neoantigénica tumoral puede comprender menos de 150 aminoácidos, preferentemente, menos de 130 aminoácidos, más preferentemente, menos de
60 100 aminoácidos, aún más preferentemente, menos de 85 aminoácidos e incluso más preferentemente, menos de 75 aminoácidos.

El método de la presente invención permite asociar más de una construcción neoantigénica tumoral a una partícula. Una construcción neoantigénica tumoral puede comprender uno o más epítopos neoantigénicos. El uso de varios
65 epítopos neoantigénicos en una partícula aumenta las posibilidades de expansión de los linfocitos T anticancerígenas. El hecho de que los polipéptidos del antígeno sean más grandes que los fragmentos presentados por las APC también

garantiza que se presentará una amplia variedad de epítomos de cada antígeno.

El método de la presente invención permite asociar una única construcción neoantigénica tumoral a una partícula dada, o asociar más de una construcción neoantigénica diferente a una partícula dada. Las partículas asociadas a una construcción o a construcciones neoantigénicas tumorales iguales se consideran la misma especie de partícula. Las partículas asociadas a una construcción o a construcciones neoantigénicas tumorales diferentes se consideran diferentes especies de partículas.

En general, se usan de 100 a 1×10^9 , por ejemplo, de 100 a 1×10^8 , por ejemplo, de 100 a 1×10^7 partículas en un ciclo de expansión, por ejemplo, de 1000 a 1×10^7 partículas. Por ejemplo, la relación entre la concentración de partículas y la concentración de células APC se sitúa entre 1000:1 y 1:10. La proporción puede optimizarse en función del tamaño de las partículas. Por ejemplo, para partículas de 1 μm de sección transversal, la relación puede estar en el intervalo de 50:1 a 2:1, por ejemplo, de 25:1 a 5:1, por ejemplo, de 15:1 a 7:1, por ejemplo, 10:1.

Las partículas pueden ser una población homogénea, es decir, todas las partículas son de la misma especie. Como alternativa, las partículas pueden ser una población heterogénea, es decir, la población de partículas comprende más de una especie de partículas. Por ejemplo, la etapa a) puede comprender adicionalmente: proporcionar una segunda especie de partículas fagocitables, que tiene una o más construcciones neoantigénicas estrechamente asociadas con la misma, en donde las construcciones neoantigénicas tumorales comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto, o una secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa en el sujeto, y en donde la secuencia de las construcciones neoantigénicas tumorales asociadas con la segunda partícula es diferente a la secuencia de las construcciones neoantigénicas tumorales asociadas con la primera partícula. Opcionalmente, puede proporcionarse una tercera y opcionalmente una cuarta y opcionalmente una 5.^a, y opcionalmente una 6.^a, y opcionalmente una 7.^a, y opcionalmente una 8.^a y opcionalmente una n.^{ésima} (en donde n puede ser cualquier número entero hasta 50) especie de partículas fagocitables, teniendo cada una de las una o más construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas a la misma, en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto, o una secuencia de aminoácidos mutados que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa del sujeto, y en donde la secuencia de la construcción o las construcciones neoantigénicas tumorales asociadas con la enésima especie de partícula es diferente de la secuencia de la construcción o las construcciones neoantigénicas tumorales asociadas con la otra especie de partícula.

Por lo tanto, en el método de la invención, una primera partícula asociada a una primera construcción neoantigénica tumoral (una partícula de una primera especie) puede utilizarse en combinación con una segunda partícula asociada a una segunda construcción neoantigénica tumoral (una partícula de una segunda especie), en donde las construcciones neoantigénicas tumorales primera y segunda tienen diferentes secuencias (por ejemplo, en donde las primeras construcciones neoantigénicas tumorales comprenden uno o más epítomos neoantigénicos diferentes en comparación con la segunda construcción neoantigénica tumoral; y preferentemente, la primera construcción neoantigénica tumoral comprende epítomos neoantigénicos que son todos diferentes en comparación con la segunda construcción neoantigénica tumoral).

También pueden utilizarse otros tipos de partículas, por ejemplo 3 o más especies de partículas (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 25, 30, 40 o 50). Preferentemente, pueden utilizarse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 especies de partículas, y más preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 especies de partículas (por ejemplo, 4, 5 o 6 tipos de partículas). En las realizaciones del método de la invención en las que se utiliza más de una especie de partícula, cada especie de partícula tiene una o más construcciones neoantigénicas tumorales asociadas con la misma que tienen diferentes secuencias respecto de las construcciones neoantigénicas tumorales asociadas con la otra especie de partícula (por ejemplo, cada especie de partícula tiene una o más construcciones neoantigénicas tumorales que comprenden uno o más epítomos neoantigénicos tumorales en comparación con las construcciones neoantigénicas tumorales asociadas con la otra especie de partículas; y preferentemente, cada especie de partículas tiene construcciones neoantigénicas tumorales asociadas con las mismas, que tienen todas diferentes epítomos neoantigénicos en comparación con las construcciones neoantigénicas tumorales asociadas con la otra especie de partículas). En las realizaciones del método de la invención en las que se utiliza más de una especie de partícula, la construcción neoantigénica tumoral en cada partícula es una construcción como se ha descrito anteriormente, que comprende uno o más epítomos neoantigénicos como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, la construcción neoantigénica tumoral asociada a cada especie de partícula tiene dos o más péptidos unidos covalentemente, y más preferentemente tres o más péptidos unidos covalentemente (por ejemplo tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez péptidos unidos covalentemente, preferentemente tres, cuatro, cinco o seis péptidos unidos covalentemente, y más preferentemente tres, cuatro o cinco péptidos unidos covalentemente), comprendiendo cada péptido una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto (y más preferentemente, cada uno es un epítopo neoantigénico). Preferentemente, cada uno de los péptidos enlazados está unido a través de un resto espaciador. Cada resto enlazador puede ser igual o puede ser diferente.

Lo más preferentemente, la construcción neoantigénica tumoral asociada a cada especie de partícula tiene tres péptidos unidos covalentemente, cada uno de los cuales comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto (y más preferentemente cada uno de los cuales es un epítipo neoantigénico). En dichas realizaciones del método de la invención, preferentemente se utilizan 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 especies de partículas, y más preferentemente 4, 5 o 6, y aún más preferentemente 5.

La degradación de antígenos por las APC no es un proceso uniforme. Esto garantiza la presentación de una amplia variedad de epítopos de cada antígeno. Por lo tanto, cuando las construcciones neoantigénicas tumorales son degradadas por las APC, esto aumenta aún más la variedad de epítopos que se presentarán. Al utilizar la ruta fagocítica de las APC, combinada con la posibilidad de que cada construcción neoantigénica tumoral tenga uno o más epítopos neoantigénicos y con la posibilidad de usar una o más construcciones neoantigénicas tumorales en una partícula, se consigue una mejor expansión de los linfocitos T. Esto se debe a que aumenta la probabilidad de proporcionar epítopos para un mayor número de linfocitos T antitumorales.

Un péptido de la construcción neoantigénica que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto, puede ser una secuencia mutada que se sabe que está presente en el tumor del sujeto. Por ejemplo, pueden conocerse los datos sobre mutaciones (tanto del exoma completo como de los análisis de puntos calientes) o el perfil de antígenos del tipo de cáncer; por ejemplo, en las bases de datos se incluyen perfiles de datos de mutaciones de determinados tipos de cáncer, como la base de datos COSMIC (accesible en <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). Los antígenos mutados en el perfil de antígenos pueden entonces ser el objetivo, es decir, uno o más péptidos de la construcción neoantigénica tumoral pueden diseñarse para tener una secuencia de aminoácidos que comprenda al menos una secuencia de aminoácidos mutada en el perfil de antígenos.

Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto de la construcción neoantigénica tumoral puede ser una secuencia que se sabe que expresa el tumor o el tejido en el que está presente el tumor. Como tales, pueden seleccionarse antígenos específicos de un cáncer concreto o de un tejido u órgano concreto en el que se localice el cáncer. Hay bases de datos disponibles, como atlas de expresión EBI (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) que proporcionan información sobre proteínas/péptidos que se expresan en tejidos u órganos restringidos. Por tanto, pueden seleccionarse péptidos únicos para las proteínas expresadas en un tejido particular.

Como alternativa (o adicionalmente) puede establecerse la secuencia de ADN de una célula cancerosa del cáncer y deducir así las mutaciones de la célula cancerosa. Las secuencias mutadas pueden entonces ser el objetivo, es decir, uno o más péptidos de la construcción neoantigénica tumoral pueden diseñarse para tener una secuencia de aminoácidos que comprenda una secuencia de aminoácidos mutada en la célula cancerosa.

En determinadas realizaciones preferidas del método de la invención, la muestra de linfocitos T procede del sujeto que se somete a tratamiento y la secuencia de uno o más péptidos de cada construcción neoantigénica tumoral procede del sujeto (en particular, procede del perfil de antígenos tumorales y/o de la secuencia de ADN de una célula cancerosa del sujeto). Preferentemente, la APC también es del sujeto. En otra realización, la muestra de linfocitos T procede del sujeto en tratamiento, la APC también es del sujeto, y la secuencia de cada péptido de cada construcción neoantigénica tumoral puede derivarse de una biblioteca de secuencias mutadas para la misma especie para el cáncer que padece el sujeto.

Célula presentadora de antígenos (APC) y muestra de linfocitos T

En el contexto de la presente invención, la APC es una célula presentadora de antígenos profesional, tal como un monocito/macrófago o una célula dendrítica. La APC puede ser una célula primaria o una célula inmortalizada. Preferentemente, la célula presentadora de antígenos es un fagocito, más preferentemente es un monocito o una célula dendrítica.

La APC debe ser compatible con los linfocitos T de la muestra de linfocitos T, de tal forma que son capaces de presentar antígenos a los linfocitos T en un contexto específico de antígeno (MHC restringido) con el que pueden reaccionar los linfocitos T. La APC y la muestra de linfocitos T se obtienen preferentemente de la misma especie y están emparejadas con el donante con respecto a los receptores del MHC. Sin embargo, también se prevé el uso de APC modificadas genéticamente a partir de una especie diferente. Más preferentemente, la APC y la muestra de linfocitos T se obtienen del mismo sujeto. Si la célula presentadora de antígenos y la muestra de linfocitos T proceden del mismo sujeto, se evita cualquier posibilidad de discordancia entre la APC y los linfocitos T.

La célula presentadora de antígenos y la muestra de linfocitos T pueden proceder de la misma muestra de sangre, lo cual es ventajoso desde un punto de vista práctico. La célula presentadora de antígenos y la muestra de linfocitos T pueden proceder de una muestra de PBMC del mismo sujeto. La obtención de PBMC a partir de muestras de sangre periférica es un protocolo rutinario, que proporciona una fuente conveniente tanto de APC como de linfocitos T al mismo tiempo y del mismo sujeto.

La muestra de PBMC puede utilizarse fresca o someterse a congelación. La posibilidad de utilizar células congeladas supone una gran ventaja práctica desde el punto de vista logístico.

- 5 La muestra de linfocitos T puede proceder de un tumor, preferentemente un vaso linfático en un tumor. Aún más preferentemente, la muestra de linfocitos T puede proceder de los ganglios centinela (es decir, los ganglios linfáticos que drenan el tumor).

- 10 La muestra de linfocitos T puede comprender PBMC enteras que incluyen linfocitos T CD4+ y CD8+, poblaciones purificadas de linfocitos T, o PBMC con agotamiento de poblaciones específicas de linfocitos T. Preferentemente, la muestra de linfocitos T comprende linfocitos T tanto CD4+ como CD8+.

- 15 Preferentemente, los linfocitos T antitumorales expandidos en el método de la invención son linfocitos T colaboradores CD4+ y/o CD8+. Los linfocitos T colaboradores CD4+ antitumorales son capaces de orquestar una respuesta antitumoral. Los linfocitos T CD8+ son capaces de atacar el tumor. Por lo tanto, una respuesta de linfocitos T mixtos puede ser beneficiosa. En los ejemplos descritos en el presente documento, hay indicios de que la mayoría de los linfocitos T antitumorales expandidos en el método de la invención son linfocitos CD4+ colaboradores.

Detalles de las etapas del método

- 20 La presente invención proporciona un método para la expansión de linfocitos T antitumorales de un sujeto con cáncer. El método de la invención se lleva a cabo *in vitro*. Preferentemente el sujeto es un mamífero y más preferentemente, un ser humano. La etapa (e) dura preferentemente de 1 día a 8 semanas, preferentemente, de 3 días a 8 semanas, preferentemente, de 1 semana a 6 semanas, y más preferentemente de 1 semana a 4 semanas. El método de la invención puede comprender además antes de la etapa (a) una etapa (a'): proporcionar una partícula fagocitable y asociar fuertemente una o más construcciones neoantigénicas tumorales a la partícula fagocitable.

- 30 En una realización del método de la invención, la partícula que tiene una o más construcciones neoantigénicas estrechamente asociadas con la misma, la célula presentadora de antígenos y la muestra de linfocitos T pueden ponerse en contacto simultáneamente, en el mismo recipiente. En otra realización, la partícula que tiene una o más construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas a ella, y la célula presentadora de antígenos se ponen primero en contacto, y posteriormente se añade la muestra de linfocitos T. En otra realización, la célula presentadora de antígenos y la muestra de linfocitos T se encuentran en una única muestra, y la partícula que tiene una o más construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas a ella se añade a la muestra de linfocitos T/células presentadoras de antígenos.

- 40 En una realización del método de la invención, la etapa (e) de poner en contacto la muestra de linfocitos T con la célula presentadora de antígenos que se ha puesto en contacto con la partícula, comprende además la adición de dosis bajas de IL-2 a la muestra de linfocitos T, por ejemplo superior a 1,25 U/ml (por ejemplo 1,25 U/ml, 2,5 U/ml, 5 U/ml o 50 U/ml), preferentemente superior a 2,5 U/ml, 5 U/ml o 50 U/ml. La expansión de los linfocitos T específicos de antígeno se produce en presencia de la célula presentadora de antígenos cuando la IL-2 está presente simultáneamente. La IL-2 promueve la diferenciación de los linfocitos T en linfocitos T efectores y en linfocitos T de memoria. Tras la expansión de linfocitos T específicos de antígeno, las células presentadoras de antígenos pueden eliminarse de la población de linfocitos T expandida, por ejemplo, mediante separación magnética.

- 45 En otra realización del método de la invención, la etapa (e) de poner en contacto la muestra de linfocitos T con la célula presentadora de antígenos que se ha puesto en contacto con la partícula, puede comprender además la adición de IL-2 y/o IL-7 y/o IL-15 a la muestra de linfocitos T, por ejemplo, una dosis baja de IL-2 a la muestra de linfocitos T, por ejemplo superior a 1,25 U/ml (por ejemplo 1,25 U/ml, 2,5 U/ml, 5 U/ml o 50 U/ml), preferentemente superior a 2,5 U/ml, 5 U/ml o 50 U/ml de IL-2, con adición opcional de IL-7 y/o IL-15.

- 50 En una realización del método de la invención, en cada una de las etapas (es decir, en las etapas (a) a (e), así como en cualquier otra etapa, cuando estén presentes) no se añade anticuerpo anti-CD3 y/o anticuerpo anti-CD28 durante ninguno de los pasos. Concretamente, no se añade anticuerpo anti-CD3 y/o anticuerpo anti-CD28 durante el paso (d) o (e) (o, cuando está presente, las etapas (e1), (f) o (g)). En una realización del método de la invención, en cada una de las etapas (es decir, en las etapas (a) a (e), así como en cualquier otro paso, cuando esté presente) las condiciones de cada paso están libres de anticuerpo anti-CD3 y/o anticuerpo anti-CD28. Concretamente, en las etapas (d) y (e), así como, cuando está presente, las etapas (e1), (f) o (g) la muestra de linfocitos T en cada paso está libre de anticuerpo anti-CD3 y/o anticuerpo anti-CD28. El anticuerpo anti-CD3 y el anticuerpo anti-CD28 pueden estimular los linfocitos T indistintamente, provocando la expansión de los linfocitos T que son inespecíficos para el antígeno de interés, así como otros linfocitos T.

- 65 En realizaciones preferidas de la invención, el método no comprende ninguna etapa de separación o aislamiento de los linfocitos T específicos de antígeno durante o después de la etapa (e) (o etapa (e1)). De manera más específica, no hay ningún paso para separar o aislar los linfocitos T que se han activado en respuesta al antígeno presentado por la célula presentadora de antígenos en la muestra de linfocitos T de los linfocitos T en la muestra de linfocitos T que

no se han activado. Esto se debe a que el método de la presente invención conduce a la expansión solo de los linfocitos T necesarios que son específicos para el antígeno que se presenta. Los linfocitos T que no se activan en respuesta al antígeno presentado por la célula presentadora de antígenos en la muestra de linfocitos T en la etapa (e) del método de la invención morirán durante el proceso. Por lo tanto, no es necesaria ninguna etapa de separación o aislamiento.

5

Lavados

Preferentemente, las condiciones en la etapa de puesta en contacto de la muestra de linfocitos T con la célula presentadora de antígenos que se ha puesto en contacto con la partícula que tiene el péptido asociado son asépticas, y más preferentemente estériles. El uso de las partículas permite la esterilización de la partícula que tiene el péptido asociado, y más especialmente permite el uso de condiciones de esterilización rigurosas, de forma que se puedan eliminar todos los patógenos, sin pérdida o destrucción de las construcciones neoantigénicas asociadas a las partículas.

Como tal, en ciertas realizaciones preferidas, el método de la invención puede comprender antes de la etapa (a) (y, según proceda, después de la etapa (a')): (a'') someter la construcción neoantigénica tumoral fuertemente asociada a la partícula a un lavado esterilizante que tenga como resultado la eliminación de materiales que pudieran ser perjudiciales para el sujeto. El lavado esterilizante también puede ser un lavado desnaturizante.

En determinadas realizaciones preferidas, el método de la invención también puede comprender antes de la etapa (a) (y, según proceda, después de la etapa (a')): (a''') someter la construcción neoantigénica tumoral fuertemente asociada a la partícula a un lavado desnaturizante que dé lugar a un nivel de endotoxinas lo suficientemente bajo como para no interferir con las etapas posteriores [es decir, las etapas (a) a (e), o cuando estén presentes, las etapas (a) a (f) o (a) a (g)].

En dichas realizaciones que comprenden la etapa (a'') y/o la etapa (a'''), el lavado esterilizante o el lavado desnaturizante puede implicar someter la partícula con las construcciones polipeptídicas asociadas a un pH elevado, por ejemplo, al menos pH 12, preferentemente, al menos pH 13, más preferentemente, al menos pH 14 y lo más preferentemente, al menos pH 14,3. Como alternativa, el lavado desnaturizante puede implicar someter la partícula con las construcciones de polipéptido asociadas a un pH bajo, por ejemplo, menor que pH 3 y más preferentemente, menor que pH 2 y lo más preferentemente, menor que pH 1.

En dichas realizaciones que comprenden la etapa (a'') y/o la etapa (a'''), el lavado esterilizante o el lavado desnaturizante pueden implicar, además o como alternativa, someter la partícula con la construcción polipeptídica asociada a una temperatura elevada, tal como al menos 90 °C, preferentemente, al menos 92 °C, más preferentemente, al menos 95 °C, por ejemplo, al menos 100 °C o al menos 110 °C. El lavado esterilizante o el lavado desnaturizante también pueden implicar, además o como alternativa, someter la partícula con la construcción polipeptídica asociada a un agente desnaturizante, tal como urea o clorhidrato de guanidina a una concentración suficiente, tal como al menos 5 M, 6 M, 7 M u 8 M.

El lavado esterilizante puede consistir en someter la partícula y la construcción polipeptídica asociada a álcali, preferentemente un álcali fuerte, por ejemplo, álcali a al menos 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M u 8 M. En determinadas realizaciones preferidas, el lavado esterilizante puede consistir en someter la partícula y la construcción polipeptídica asociada a hidróxido sódico (NaOH) al menos 1 M, preferentemente, NaOH al menos 2 M. Otros álcalis que pueden usarse incluyen, pero sin limitación: hidróxido de litio (LiOH), hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de rubidio (RbOH), hidróxido de cesio (CsOH), hidróxido de magnesio (Mg(OH)₂), hidróxido de calcio (Ca(OH)₂), hidróxido de estroncio (Sr(OH)₂) e hidróxido de bario (Ba(OH)₂).

El lavado esterilizante puede consistir en someter la partícula y la construcción polipeptídica asociada a ácido, preferentemente un ácido fuerte, por ejemplo, ácido a al menos 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M u 8 M. En determinadas realizaciones preferidas, el lavado esterilizante puede consistir en someter la partícula y la construcción polipeptídica asociada a ácido clorhídrico (HCl) 1 M como mínimo, preferentemente, HCl 2 M. Otros ácidos que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación: ácido yodhídrico (HI), ácido bromhídrico (HBr), ácido perclórico (HClO₄), ácido nítrico (HNO₃) y ácido sulfúrico (H₂SO₄).

En realizaciones preferidas, el lavado esterilizante da como resultado que las partículas y las construcciones de polipéptido asociadas sean asépticas y más preferentemente, que las partículas y las construcciones de polipéptido asociadas sean estériles. Aséptico se define en el presente documento como exento de bacterias causantes de enfermedades u otros microorganismos vivos. En el presente documento, estéril se define como exento de bacterias u otros microorganismos vivos.

En realizaciones preferidas, el lavado desnaturizante da lugar a una cantidad de endotoxina tal que en la concentración final de endotoxina es inferior a 100 pg/ml, preferentemente inferior a 50 pg/ml, más preferentemente, inferior a 25 pg/ml y lo más preferentemente, inferior a 10 pg/ml.

Si el preparado se contamina con microorganismos viables, es probable que las etapas posteriores del cultivo celular

se vean comprometidas. Por tanto, en métodos preferidos de la invención, la partícula con la construcción de polipéptido asociada de la etapa (a) se ha sometido a un lavado esterilizante que da como resultado una concentración de microorganismos y endotoxinas lo suficientemente baja como para no interferir con las etapas posteriores.

La forma particular del lavado esterilizante no es crítica en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, el lavado esterilizante puede consistir en someter la partícula y la construcción polipeptídica asociada a un pH elevado, a un pH bajo, a una temperatura elevada, a un agente esterilizante/desnaturalizante o a una combinación de los mismos. Preferentemente, el lavado esterilizante implica someter la partícula y la construcción polipeptídica asociada a un pH elevado o a un agente esterilizante/desnaturalizante fuerte, como urea 8 M o guanidina-HCl 6 M. Lo más preferentemente, el lavado esterilizante consiste en someter la partícula y la construcción polipeptídica asociada a un pH elevado de al menos 13,0, más preferentemente, al menos 14,0, lo más preferentemente, al menos 14,3. Preferentemente, la desnaturalización puede implicar someter la partícula y la construcción polipeptídica asociada a un lavado con álcali fuerte 1-5 M, preferentemente 1-3 M, más preferentemente 1,5-2,5 M, lo más preferentemente 2 M, tal como NaOH o KOH, preferentemente NaOH.

Una ventaja particular del lavado esterilizante es que las condiciones pueden seleccionarse de forma que la preparación con las partículas y la construcción polipeptídica asociada se esterilicen y desnaturalicen en una sola etapa. Concretamente, un lavado a pH alto (por ejemplo, pH >14) puede convenientemente esterilizar simultánea y rápidamente la preparación y lograr un lavado desnaturalizante eficaz para eliminar endotoxinas.

El lavado esterilizante puede comprender un solo lavado o varios lavados repetidos, tal como 2, 3, 4 o 5 lavados. El lavado desnaturalizante puede comprender un único lavado o varios lavados repetidos, tal como 2, 3, 4 o 5 lavados.

Determinación del grado de activación de los linfocitos T

Después de la etapa (e), el método de la invención puede comprender además una etapa de determinar el grado de activación de los linfocitos T antitumorales en la muestra de linfocitos T, por ejemplo, comparando el grado de activación de los linfocitos T antitumorales con una referencia relevante, por lo que un mayor grado de activación de linfocitos T antitumorales en la muestra en comparación con la referencia indica la conclusión de que uno o más determinantes neoantigénicos tumorales dan como resultado una activación de linfocitos T antitumorales en la muestra. La determinación del grado de activación de linfocitos T antitumorales en la muestra de linfocitos T puede implicar la determinación de la fracción de linfocitos T activados en la muestra. La determinación del grado de activación de linfocitos T antitumorales en la muestra de linfocitos T puede realizarse mediante una técnica ELISpot o FluoroSpot.

El método de la invención puede comprender la etapa de comparar el grado de activación de linfocitos T con una referencia relevante, por lo que un mayor grado de activación de linfocitos T en la muestra en comparación con la referencia lleva a la conclusión de que el antígeno candidato produce una activación de linfocitos T específicos del antígeno en la muestra. La referencia es fundamental para definir la "activación", por lo que el grado de activación se define preferentemente en comparación con las muestras de referencia. Las muestras de referencia pueden, por ejemplo, ser muestras de tejido normal cuando se analizan muestras de tumores o de ganglios linfáticos que drenan en tumores. Las muestras de referencia se utilizan para fijar el umbral de la conclusión diagnóstica/pronóstica, y determinar el antígeno específico positivo, es decir, la activación, o negativo, es decir, la regulación a la baja.

La determinación del grado de activación de los linfocitos T en la muestra de linfocitos T puede implicar la determinación de la fracción de linfocitos T activados en la muestra, es decir, el número de linfocitos T activados en relación con el total de linfocitos T de la muestra. La fracción de células activadas en relación con la fracción de células activadas en la muestra de referencia proporcionará una medida de la magnitud de la activación de los linfocitos T. Preferentemente, en cada análisis se determina el nivel de activación espontánea ("nivel de activación de fondo") en muestras individuales en muestras incubadas sin antígeno, es decir, el control negativo. La activación de fondo puede compensarse en el análisis; en otras palabras, las fracciones de activación pueden calcularse sobre valores netos a los que se resta la fracción de activación del control negativo.

Existen varios métodos adecuados para determinar la activación de linfocitos T específicos de antígeno, entre los que se incluyen ELISpot, FluoroSpot, tinción intracelular de citocinas con citometría de flujo, FASCIA, ensayos de proliferación (por ejemplo, incorporación de timidina, tinción CFSE o BrdU), detección específica del TCR con tetrameros MHC-I o II, y análisis ELISA o Luminex de las citocinas secretadas.

Con la técnica ELISpot, se detecta directamente la liberación de una citocina específica por las células en respuesta a un estímulo. Las células se siembran en una membrana y se mide el número de células secretoras de citocinas. Dependiendo de la citocina que se esté midiendo, pueden medirse distintas variables, como la activación de macrófagos o linfocitos T. FluoroSpot se basa en la técnica ELISpot y permite lecturas simultáneas de varias citocinas secretadas diferentes. Esto permite una estimación más exacta y matizada de la activación celular. Ambos métodos ofrecen una forma rápida y sencilla de medir la activación de los linfocitos T. Preferentemente, la determinación del grado de activación de linfocitos T en la muestra de linfocitos T puede realizarse mediante una técnica ELISpot/FluoroSpot o un ensayo de proliferación (es decir, incorporación de timidina). La determinación del grado de

activación de los linfocitos T en la muestra de linfocitos T puede comprender la determinación de la fracción de linfocitos T que se ponen en contacto con la célula presentadora de antígenos que responden mediante la secreción de interferón gamma (IFN-γ), interleucina 17 (IL-17), Interleucina 22 (IL-22) o una combinación de las mismas, por ejemplo, mediante un ensayo ELISpot o FluoroSpot. Pueden utilizarse otros analitos pertinentes (combinación(es) de citocinas) para analizar enfermedades o afecciones específicas, como las citocinas de T-reg.

Etapas de activación adicional opcional

En determinadas realizaciones del método de la invención, el método comprende además, después de la etapa (e) (por ejemplo, inmediatamente después de la etapa (e) o inmediatamente después de la etapa (f), o inmediatamente después de la etapa (g); preferentemente inmediatamente después de la etapa (e) o inmediatamente después de la etapa (f)):

e1) poner en contacto la muestra de linfocitos T con una segunda célula presentadora de antígenos puesta en contacto con una segunda partícula *in vitro* en condiciones que permitan la activación específica de linfocitos T antitumorales en respuesta al antígeno presentado por la célula presentadora de antígenos.

La etapa (e1) actúa ventajosamente como una segunda ronda de activación y estimulación ("reestimulación") de los linfocitos T. Por tanto, la etapa (e1) puede denominarse etapa de "reestimulación". La etapa (e1) puede, por ejemplo, durar de 1 a 4 semanas y más preferentemente, de 2 a 3 semanas.

Preferentemente, en determinadas realizaciones del método de la invención, el método comprende además, después de la etapa (e) (por ejemplo, inmediatamente después de la etapa (e) o inmediatamente después de la etapa (f), o inmediatamente después de la etapa (g); preferentemente inmediatamente después de la etapa (e) o inmediatamente después de la etapa (f)):

a1) proporcionar una segunda partícula fagocitable, que tiene una o más construcciones neoantigénicas estrechamente asociadas con la misma, en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto, o una secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa del sujeto;

b1) proporcionar una segunda célula presentadora de antígenos viable;

c1) poner en contacto la segunda partícula con la segunda célula presentadora de antígenos *in vitro* en condiciones que permitan la fagocitosis de la partícula por la célula presentadora de antígenos; y

e1) poner en contacto la muestra de linfocitos T con la segunda célula presentadora de antígenos puesta en contacto con la segunda partícula *in vitro* en condiciones que permitan la activación específica de linfocitos T antitumorales en respuesta al antígeno presentado por la célula presentadora de antígenos.

La etapa (e1) (o, cuando está presente, las etapas (a1) a (e1)) se realizan preferentemente después de la etapa (e) y/o (f) y/o (g) cuando disminuye la tasa de expansión de la muestra de linfocitos T. Preferentemente, la etapa (e) dura de 2 a 4 semanas (que es cuando se espera que disminuya la tasa de expansión de la muestra de linfocitos T durante la etapa (e)), y la etapa (e1) (o, cuando está presente, las etapas (a1) a (e1)) se realizan después de la etapa (e).

En las realizaciones en las que la etapa (e1) es posterior a la etapa (f), el método puede comprender además (f1): determinar el grado de activación de los linfocitos T antitumorales en la muestra de linfocitos T, por ejemplo, comparando el grado de activación de los linfocitos T antitumorales con una referencia relevante, por lo que un mayor grado de activación de linfocitos T antitumorales en la muestra en comparación con la referencia indica la conclusión de que uno o más determinantes neoantigénicos tumorales dan como resultado una activación de linfocitos T antitumorales en la muestra.

En las realizaciones en las que la etapa (e1) es posterior a la etapa (g), el método puede comprender además (g1): eliminar las partículas y las células presentadoras de antígeno de la muestra de linfocitos T expandidos.

La segunda partícula fagocitable que tiene una o más construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas a ella puede ser la misma que la partícula fagocitable, que tenga una o más construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas de la etapa (a), o puede ser diferente. Preferentemente es la misma.

La segunda célula presentadora de antígenos viable puede ser la misma que la célula presentadora de antígenos viable de la etapa (b), o puede ser diferente. Preferentemente es la misma.

Eliminación de partículas

Después de la etapa (e) (y, en su caso, después de la etapa (e1)), el método de la invención puede comprender además la etapa (f) retirar la partícula de la muestra de linfocitos T; y/o (g) retirar la partícula y la célula presentadora

de antígenos de la muestra de linfocitos T.

Las partículas y cualquier célula presentadora de antígenos que tenga partículas internalizadas pueden eliminarse ventajosamente por completo de la muestra de linfocitos T utilizando un imán o un campo magnético, por ejemplo, antes de transfundir la muestra de linfocitos T expandidos de nuevo al sujeto. Como tales, la muestra de linfocitos T al final del método de la invención comprende solo los linfocitos T expandidos y cualquier célula presentadora de antígenos que no tenga una partícula atrapada. Por lo tanto, en determinadas realizaciones preferidas del método de la invención, la etapa (f) comprende retirar la partícula de la muestra de linfocitos T mediante un imán o un campo magnético. La eliminación de las partículas en la etapa (f) también elimina las células presentadoras de antígenos que tienen una partícula internalizada. Típicamente, las células presentadoras de antígeno que tengan una partícula internalizada estarán muertas cuando las partículas (y las células presentadoras de antígeno que tengan una partícula internalizada) se retiren en la etapa (f) o (g).

Tratamientos

El método de la invención proporciona linfocitos T antitumorales. Los linfocitos T antitumorales son útiles en el tratamiento del cáncer en el sujeto. Los linfocitos T son las células obtenidas tras la etapa (f) o (g) del método de la invención. Los linfocitos T expandidos pueden administrarse por vía intravenosa, intraarterial, intratecal o intraperitoneal.

El cáncer puede ser cualquier forma de cáncer sólido. Un cáncer sólido en el contexto de la presente invención es una masa anormal de tejido que se origina en un órgano. Un cáncer sólido no suele contener quistes ni zonas líquidas. El cáncer sólido puede ser maligno. Los diferentes tipos de cánceres se nombran por el tipo de células que los forman. Entre los tipos de cáncer sólido se incluyen los sarcomas, carcinomas y linfomas.

La presente invención proporciona una composición que comprende linfocitos T antitumorales producidos por un método que comprende las etapas de:

a) proporcionar una partícula fagocitable, teniendo la partícula propiedades paramagnéticas y una o más construcciones neoantigénicas tumorales asociadas estrechamente a las mismas, en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con el cáncer en el sujeto, o una secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa del sujeto;

b) proporcionar una célula presentadora de antígenos viable;

c) poner en contacto la partícula con la célula presentadora de antígenos *in vitro* en condiciones que permitan la fagocitosis de la partícula por la célula presentadora de antígenos;

d) proporcionar una muestra de linfocitos T que comprende linfocitos T viables del sujeto;

e) poner en contacto la muestra de linfocitos T con la célula presentadora de antígenos contactada con la partícula *in vitro* en condiciones que permitan la activación específica y la expansión de linfocitos T antitumorales en respuesta al antígeno presentado por la célula presentadora de antígenos;

(f) retirar la partícula de la muestra de linfocitos T y/o retirar la partícula y la célula presentadora de antígenos de la muestra de linfocitos T;

en donde la muestra de linfocitos T de las etapas (d) a (f) está libre de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28.

La composición de linfocitos T de la invención comprende una mezcla de linfocitos T CD4⁺ colaboradores y CD8⁺. Por ejemplo, en una realización, la mezcla puede comprender predominantemente linfocitos T CD4⁺ colaboradores y también CD8⁺.

La presente invención también proporciona una composición que comprende linfocitos T antitumorales producidos por el método descrito anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

Algunos ejemplos de cánceres sólidos son el cáncer suprarrenal, cáncer anal, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma de linfocitos B, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga urinaria, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, cáncer ocular, cáncer de vesícula biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, tumor del estroma gastrointestinal (GIST, por sus siglas en inglés), enfermedad trofoblástica gestacional, linfoma hepatoesplénico de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, cáncer de riñón, cáncer de laringe e hipofaringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (microcítico y no microcítico), tumor carcinoide pulmonar, granulomatosis linfomatoide, mesotelioma maligno, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma de linfocitos B de la zona marginal ganglionar, linfoma no

hodgkiniano, cáncer de la cavidad oral y orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, tumores hipofisarios, linfoma de efusión primario, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma, cáncer de piel (basocelular y escamocelular, melanoma y de células de Merkel), cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, sarcoma

5 uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms. La composición de linfocitos T de la invención es especialmente eficaz en el tratamiento de cánceres sólidos. Como tales, el sujeto de la invención puede tener un cáncer sólido. La composición de linfocitos T de la invención es particularmente eficaz en el tratamiento de cánceres sólidos seleccionados entre el grupo que consiste en: cáncer anal, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (microcítico y no

10 microcítico), tumor carcinoide pulmonar, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer testicular, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, y aún más especialmente para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (microcítico y no microcítico), tumor carcinoide pulmonar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de vejiga urinaria.

15 La composición de linfocitos T de la invención también es especialmente eficaz en el tratamiento de cánceres sólidos metastásicos. El cáncer metastásico es un cáncer que se ha extendido desde el lugar de origen primario a una o más zonas diferentes del cuerpo.

20 Como alternativa, el cáncer puede ser cualquier forma de neoplasia hematológica maligna. Una neoplasia hematológica maligna en el contexto de la presente invención es una forma de cáncer que comienza en las células del tejido hematopoyético, como la médula ósea o el sistema linfático. En muchas neoplasias hematológicas malignas, el proceso normal de desarrollo de las células sanguíneas se interrumpe por el crecimiento incontrolado de un tipo anormal de célula sanguínea. Algunos ejemplos de cáncer hematológico son las leucemias, linfomas, mielomas y

25 síndromes mielodisplásicos (los linfomas pueden clasificarse a su vez como cáncer sólido y neoplasia hematológica).

Algunos ejemplos de neoplasias hematológicas son la leucemia basófila aguda, leucemia eosinofílica aguda, leucemia eritroide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia monocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda con maduración, leucemia mielógena aguda, leucemia mielóide aguda de células

30 dendríticas, leucemia promielocítica aguda, leucemia/linfoma de linfocitos T en el adulto, leucemia agresiva de células NK, linfoma anaplásico de células grandes y plasmacitoma, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, leucemia de linfocitos B, linfoma de linfocitos B, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, mielofibrosis idiopática crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia neutrofílica crónica, tricoleucemia extramedular, linfoma hepatoesplénico de linfocitos T, linfoma de

35 Hodgkin, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, enfermedad de Kahler, granulomatosis linfomatoide, leucemia de mastocitos, mieloma múltiple, mielomatosis, linfoma de linfocitos B de la zona marginal ganglionar, linfoma no hodgkiniano, leucemia de células plasmáticas, linfoma de efusión primaria y macroglobulinemia de Waldenström.

40 En una realización preferida, cuando la composición de linfocitos T de la invención se utiliza en el tratamiento del cáncer en un sujeto, dicho sujeto no ha recibido quimioterapia para reducir el número de células inmunitarias en el organismo en el plazo de 1 semana antes (preferentemente en el plazo de 4 semanas antes) de la administración de la composición de linfocitos T de la invención.

Una ventaja de la presente invención es que solo es necesario repetir el tratamiento con la composición de linfocitos

45 T antitumorales de la invención si se agotan los linfocitos T de memoria que reconocen el neoantígeno o los neoantígenos, o si el cáncer evoluciona de modo que en el tumor hay neoantígenos diferentes del neoantígeno o los neoantígenos originales a los que se dirigen los linfocitos T. Si ese es el caso, y el cáncer se vuelve resistente al tratamiento inicial con linfocitos T, el tratamiento puede llevarse a cabo una segunda vez administrando otra composición de linfocitos T de la invención, en donde en la etapa (a) las partículas fagocitables tienen diferentes

50 construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas a ellas en comparación con la construcción o las construcciones neoantigénicas tumorales utilizadas para producir el linfocito T del tratamiento anterior. Por ejemplo, la construcción del neoantígeno tiene una secuencia diferente, por ejemplo, que comprenda uno o más epítopos neoantigénicos diferentes en comparación con las construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas con la partícula fagocitable utilizada en el método anterior para hacer la primera composición de linfocitos T

55 antitumorales; o la construcción neoantigénica comprende todos los epítopos neoantigénicos diferentes en comparación con las construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas con la partícula fagocitable utilizada en el método anterior para preparar la primera composición de linfocitos T antitumorales. Por ejemplo, los epítopos neoantigénicos del segundo tratamiento son epítopos que no estaban presentes en el primer tratamiento, por ejemplo, porque en ese momento aún no se habían desarrollado en el tumor.

60 La presente invención también proporciona una composición que comprende linfocitos T antitumorales producidos como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en donde tras la administración de la composición que comprende linfocitos T antitumorales al sujeto, se controla la presencia en el sujeto de linfocitos T específicos para neoantígenos (por ejemplo, linfocitos T de memoria) derivados de los linfocitos

65 T antitumorales producidos como se ha descrito anteriormente a los X días de la administración de la composición, en donde X es aproximadamente 7, 14, 21, 28, 30, 35, 42, 49, 56, 60, 90, 120, 150, 180, 300 y/o 365 días; y opcionalmente

se administran al sujeto otros linfocitos T antitumorales producidos como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también proporciona una composición que comprende linfocitos T antitumorales producidos como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer recidivante en un sujeto que ha sido tratado previamente con una primera composición de linfocitos T antitumorales producida según la invención, en donde la composición que comprende linfocitos T antitumorales se produce como se ha descrito anteriormente, en donde en la etapa (a) y las construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas con la partícula fagocitable tienen una secuencia diferente a las construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas con la partícula fagocitable utilizada en el método para hacer la primera composición de linfocitos T antitumorales producida como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, en la etapa (a), las construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas con la partícula fagocitable comprenden uno o más epítomos neoantigénicos diferentes en comparación con las construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas con la partícula fagocitable utilizada en el método para producir la primera composición de linfocitos T antitumorales producida como se ha descrito anteriormente; y preferentemente en la etapa (a), las construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas con la partícula fagocitable comprenden todos los epítomos neoantigénicos diferentes en comparación con las construcciones neoantigénicas tumorales estrechamente asociadas con la partícula fagocitable utilizada en el método para producir la primera composición de linfocitos T antitumorales producida como se ha descrito anteriormente.

Partículas:

En el presente documento se divulga (pero no se reivindica), una partícula fagocitable paramagnética o superparamagnética, que tiene una o más construcciones neoantigénicas estrechamente asociadas con la misma, en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto.

Preferentemente, las partículas pueden tener una dimensión mayor de menos de 5,6 μm , preferentemente de menos de 4 μm , más preferentemente de menos de 3 μm , por ejemplo, de menos de 2,5 μm , de menos de 2 μm o de menos de 1,5 μm . Las partículas pueden utilizarse en un método de la invención y preferentemente pueden tener una dimensión de más de 0,001 μm , preferentemente de más de 0,005 μm , preferentemente de más de 0,01 μm , preferentemente de más de 0,05 μm , preferentemente de más de 0,1 μm , más preferentemente de más de 0,2 μm y aún más preferentemente de más de 0,5 μm . Preferentemente, las partículas pueden tener una dimensión mayor en el intervalo de 0,1-5,6 μm , preferentemente de 0,2-5,6 μm , preferentemente de 0,5-5,6 μm , preferentemente de 0,1-4 μm , preferentemente de 0,5-4 μm , más preferentemente de 0,1-3 μm , más preferentemente de 0,5-3 μm , incluso más preferentemente de 0,1-2,5 μm , incluso más preferentemente de 0,5-2,5 μm , incluso más preferentemente de 0,2-2 μm , incluso más preferentemente de 0,5-2 μm , más preferentemente 1-2 μm , o por ejemplo, aproximadamente 1 μm , aproximadamente 1,5 μm o aproximadamente 2 μm (preferentemente aproximadamente 1 μm). Preferentemente, la partícula es sustancialmente esférica.

Preferentemente, la construcción neoantigénica tumoral se une covalentemente a la partícula. Por ejemplo, el polipéptido puede unirse mediante un enlace de amida entre un grupo amina o un grupo ácido carboxílico del polipéptido y un grupo ácido carboxílico o un grupo amina de la superficie de la partícula.

Como alternativa, el polipéptido candidato a antígeno puede estar unido a las partículas mediante un quelato metálico.

Por ejemplo, las partículas unidas con un ligando quelante metálico, tal como el ácido iminodiacético pueden unir iones metálicos como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} o Fe^{3+} . A su vez, estos quelatos metálicos pueden unirse con gran fuerza a proteínas y péptidos que contengan, por ejemplo, histidina o cisteína. Por lo tanto, las partículas con quelatos metálicos pueden adsorber péptidos/proteínas de forma no covalente, de forma que permita un lavado riguroso para reducir la cantidad de LPS y otros componentes contaminantes en los péptidos/proteínas unidos.

La partícula puede comprender polímero, vidrio o material cerámico (por ejemplo, la partícula puede ser una partícula polimérica, una partícula de vidrio o una partícula de cerámica). Preferentemente, la partícula comprende un polímero aromático sintético, tal como poliestireno u otro polímero, tal como polietileno. La partícula puede comprender un polímero de polisacárido, por ejemplo agarosa. Preferentemente, la partícula no comprende polímero de polisacárido (y preferentemente no es una partícula de polímero de polisacárido). Preferentemente, la partícula es una partícula de poliestireno o polietileno, y más preferentemente es una partícula de poliestireno. Preferentemente, la partícula es una partícula monodispersa (es decir, una partícula con un tamaño uniforme).

Kits

En el presente documento también se divulga (pero no se reivindica) un kit que comprende una partícula fagocitable paramagnética o superparamagnética (es decir, una partícula fagocitable paramagnética o superparamagnética, que tiene una o más construcciones neoantigénicas estrechamente asociadas con la misma, en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto) y reactivos adecuados para su uso en la

expansión de una población de linfocitos T. El kit puede comprender además reactivos para ayudar a expandir una población de linfocitos T, tal como IL-2. Opcionalmente, también puede comprender IL-7 y/o IL-15. El kit puede comprender además reactivos para esterilizar la partícula.

- 5 Preferentemente, el kit no comprende anticuerpo anti-CD3 y/o anticuerpo anti-CD28.

En el presente documento también se divulga (pero no se reivindica) un kit que comprende una partícula fagocitable paramagnética o superparamagnética, reactivos de acoplamiento para acoplar un péptido a la partícula fagocitable, y reactivos adecuados para su uso en la expansión de una población de linfocitos T.

- 10 El kit puede comprender además instrucciones para diseñar construcciones neoantigénicas tumorales. El kit puede comprender además reactivos para producir construcciones neoantigénicas tumorales, por ejemplo, vectores listos para su uso ajustados a diferentes condiciones de clonación y expresión. El kit puede comprender también o como alternativa una o más construcciones neoantigénicas tumorales, por ejemplo, puede comprender una biblioteca de construcciones neoantigénicas tumorales para uno o más cánceres específicos. El kit puede comprender uno o más epítopos neoantigénicos. Por ejemplo, puede comprender una biblioteca de epítopos neoantigénicos para uno o más cánceres específicos. El kit puede comprender instrucciones y/o reactivos para producir construcciones neoantigénicas tumorales a partir de los epítopos neoantigénicos (y opcionalmente una o más moléculas espaciadoras).

- 20 El kit puede comprender además reactivos para ayudar a expandir una población de linfocitos T, tal como IL-2. Opcionalmente, también puede comprender IL-7 y/o IL-15. El kit puede comprender además reactivos para esterilizar la partícula.

- 25 Preferentemente, el kit no comprende anticuerpo anti-CD3 y/o anticuerpo anti-CD28. Preferentemente, el kit incluye instrucciones para no añadir anticuerpo anti-CD3 y/o anticuerpo anti-CD28 cuando se utilice el kit, por ejemplo utilizado en un método de la invención. El kit también puede incluir instrucciones para no separar los linfocitos T activados en la muestra de linfocitos T antes de expandir los linfocitos T.

30 Ejemplos

Ejemplo 1: acoplamiento de polipéptidos a partículas

- 35 Los polipéptidos se acoplaron covalentemente a partículas paramagnéticas que contenían grupos libres de ácido carboxílico. Se utilizaron Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid (ThermoFischer Scientific) (microesferas de 1 µm de diámetro) como partículas. El procedimiento de acoplamiento se llevó a cabo según el protocolo del fabricante (procedimiento en dos etapas utilizando NHS (N-hidroxisuccinimida) y EDC (etil carbodiimida)):

- 40 Las partículas se lavaron dos veces con tampón MES (MES 25 mM (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), pH 6). A continuación, se activaron los grupos de ácido carboxílico añadiendo 50 mg/ml de NHS (N-hidroxisuccinimida) y 50 mg/ml de EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida) en tampón MES a las partículas y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las partículas se recogieron con un imán, se eliminó el sobrenadante y se lavaron dos veces con tampón MES. La proteína se diluyó en tampón MES hasta una concentración de 1 mg/ml, total 100 µg y se añadieron a las partículas y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las partículas se recogieron con un imán y se extrajo el sobrenadante, que se guardó para medir la concentración de proteína. Los grupos de ácido carboxílico activados que no reaccionaron se inactivaron con Tris 50 mM a pH 7,4 durante 15 minutos. A continuación, las partículas se lavaron con PBS pH 7,4 y se almacenaron a -80 °C.

- 50 Para medir la cantidad de proteína acoplada a las partículas, se utilizó un kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific) para medir la concentración de proteínas de la proteína antes del acoplamiento, así como en el sobrenadante después del acoplamiento. El ensayo BCA se utilizó según el protocolo del fabricante.

- Se utilizó el ensayo de proteínas con ácido bicinonínico, BCA, para medir la concentración de proteínas antes y después del acoplamiento, con el fin de garantizar el éxito del mismo. Se probaron varios polipéptidos y una media de 48,7 µg (media: 48,7, DE: 20,5, N = 10) se acopló por cada 1 mg de partículas. Siguiendo las instrucciones del fabricante, pueden acoplarse 50 µg de polipéptido por cada 1 mg de partículas, lo que indica que la eficacia del acoplamiento realizado en este ejemplo fue alta.

60 Ejemplo 2: lavados

- Las partículas se acoplaron a una proteína recombinante producida en *E. coli*. Las partículas se lavaron con una de 3 diferentes soluciones de lavado, NaOH 2 M a pH 14,3, urea 8 M o guanidina (guanidina-HCl) 6 M, todo en agua estéril a TA, o se incubaron en PBS a 95 °C. Las partículas se suspendieron en el tampón y se agitaron durante 4 min, se recogieron con un imán y se eliminó el sobrenadante. Esto se repitió 3 veces. Las partículas tratadas térmicamente se introdujeron en PBS a pH 7,4 y se colocaron en un termobloque a 95 °C durante 5 minutos, después se recogieron con un imán y se elimina el sobrenadante. Esto se repitió 3 veces. A continuación, las partículas se lavaron 3 veces

con PBS estéril para eliminar cualquier resto de tampón de lavado.

Se probaron cuatro condiciones de lavado diferentes: (a) pH elevado (NaOH 2 M a pH 14,3), (b) Calor (95 °C) y agentes esterilizantes/desnaturalizantes ((c) Urea 8 M y (d) guanidina clorhidrato 6 M).

5

Después del lavado, el polipéptido asociado a las partículas permaneció asociado a las partículas.

Ejemplo 3a: Identificación del tamaño adecuado de las partículas fagocitables

10 Se utilizó un ensayo de proliferación con incorporación de timidina para comprobar el efecto del tamaño de las partículas en la activación de linfocitos T específicos de antígeno. Se estimularon esplenocitos de ratones inmunizados con ovoalbúmina (OVA) con partículas acopladas de OVA de diferentes tamaños para medir la proliferación específica del antígeno.

15 Se acoplaron partículas paramagnéticas con un diámetro de 5,6 µm, 1 µm y 0,2 µm con ácido carboxílico en su superficie, con ovoalbúmina o seroalbúmina bovina de acuerdo con el protocolo en el Ejemplo 1.

Para comprobar la eficacia de las partículas para estimular la activación de linfocitos T específicos de antígeno se utilizó un ensayo de proliferación (con incorporación de timidina 3H). La concentración de partículas en relación con la concentración de células fue de 1:1 para las partículas de 5,6 µm, 10:1 para las partículas de 1 µm y 500:1 para las partículas de 0,2 µm. La concentración total de proteínas durante la incubación con las células se calculó en 125 ng/ml, 160 ng/ml y 160 ng/ml para las de 5,6 µm, 1 µm y 0,2 µm, respectivamente. El ensayo de proliferación se realizó del siguiente modo:

20 Ensayo de proliferación con incorporación de timidina con esplenocitos de ratones sensibilizados a la ovoalbúmina. Como estímulos, se utilizaron ovoalbúmina (SigmaAldrich) y BSA (SigmaAldrich) acopladas a microesferas (Dynabeads® MyOne™ Carboxylic Acid). Se inmunizó a los ratones con ovoalbúmina mediante inyecciones mensuales de 100 µg de ovoalbúmina (Sigma) adsorbida en hidróxido de aluminio. Tres meses después de la primera inyección, se sacrificaron los ratones y se recogieron los bazo. Los esplenocitos se prepararon mediante procedimientos estándar, como se describe en Thunberg *et al.* 2009, Allergy 64:919.

30 Las células se incubaron en cRPMI con microesferas acopladas a ovoalbúmina o con microesferas acopladas a BSA (10 microesferas por célula) durante 5 días. Todas las células se incubaron durante 6 días en una atmósfera humidificada con un 6 % de CO₂ a 37 °C. Se añadió 3 Ci/pocillo de [3H] timidina a los cultivos celulares durante las últimas 18 horas de incubación. Los recuentos medios por minuto (cpm) obtenidos a partir de triplicados estimulados se dividieron entre los valores medios de cpm de células no estimuladas y se expresaron como índices de estimulación (IE). Los valores de IE ≥2,0 suelen considerarse positivos.

40 Como se observa en la Figura 1, las células incubadas con partículas de OVA de 0,2 µm de diámetro mostraron un aumento de la proliferación con un IE medio de 4,1 (IC del 95 %: 2,4-5,8, P = 0,007). Las células incubadas con partículas de OVA con un diámetro de 1 µm mostraron un aumento de la proliferación con un IE medio de 8,4 (IC del 95 %: 6,1-10,6, P < 0,005). Las células incubadas con partículas de OVA con un diámetro de 5,6 µm no consiguieron estimular la proliferación, IE medio: 1,1 (IC del 95 %: 0,4-2,7, P = 0,876).

45 Estos resultados demuestran que el antígeno acoplado a partículas de diferentes tamaños puede estimular la proliferación celular. Las partículas con un diámetro de aproximadamente 1 µm parecen ser las más eficaces en lo que respecta a la estimulación celular, pero las partículas de un tamaño inferior a 0,2 µm siguen funcionando. Es razonable predecir que las partículas de tamaños superiores a 1 µm también funcionan, aunque a medida que el diámetro se aproxima a 5,6 µm, las partículas dejan completamente de estimular las células. Es razonable suponer que 1 µm es un tamaño óptimo, ya que es similar al tamaño de las bacterias. Nuestro sistema inmunitario ha evolucionado para fagocitar y reaccionar ante microorganismos/partículas de este tamaño. Una célula presentadora de antígenos normal tiene un tamaño del orden de 10-15 µm.

Ejemplo 3b: comparación de partículas acopladas a antígenos de diferentes tamaños y su eficacia en la activación y expansión de linfocitos T

55

(i) Preparación de partículas fagocitables acopladas a antígenos:

Se utilizaron tres tipos de partículas paramagnéticas de poliestireno fagocitables de diferentes tamaños:

- 60
- diámetro de 1 µm (Dynabeads MyOne Carboxylic Acid, ThermoFisher),
 - diámetro de 2,8 µm (Dynabeads M-270 Carboxylic acid, ThermoFisher) y
 - diámetro de 4,5 µm (Dynabeads M-450 Epoxy, ThermoFisher).

65 Las partículas fagocitables se acoplaron al antígeno (proteína PP65 de citomegalovirus) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar la endotoxina, todas las partículas fagocitables se lavaron cinco veces con un tampón de hidróxido de sodio 0,75 M y posteriormente se resuspendieron en PBS estéril.

(ii) Incubación de partículas fagocitables acopladas al antígeno:

- 5 Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante sano, aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad estándar basada en ficoll se cultivaron junto con las partículas fagocitables acopladas a antígeno (en lo sucesivo, "partículas acopladas a antígeno") en una placa de 48 pocillos durante 18 h a 37 °C, CO₂ al 5 %, 500 000 células/pocillo a una concentración de 1 000 000 células/ml. La concentración de partículas acopladas al antígeno se igualó en función de la superficie total (un marcador sustitutivo de la cantidad de antígeno, ya que se une a la superficie de las partículas acopladas al antígeno). Esto equivale a 10 partículas acopladas al antígeno/PBMC para las partículas de 1 µm, 1,4 partículas acopladas al antígeno/PBMC para las partículas de 2,8 µm y 0,5 partículas acopladas al antígeno/PBMC para las partículas de 4,5 µm, en función del número total de PMBC de la muestra.

Tabla 1

Tamaño de las partículas fagocitables	Número de PBMC en la muestra	Proporción de partículas acopladas al antígeno en relación con las PBMC	Número de partículas acopladas al antígeno en la muestra
1 µm	500 000	10:1	5 000 000
2,8 µm	500 000	1,4:1	700 000
4,5 µm	500 000	0,5:1	250 000

(iii) Evaluación de la captación:

- Después de la incubación, el número de partículas acopladas al antígeno fagocitadas se contó manualmente utilizando un microscopio confocal. Se contaron ocho células para obtener los valores medios y la desviación estándar. En la Figura 5A, se muestran imágenes del microscopio confocal de células representativas con partículas intracelulares de antígeno acoplado fagocitadas. La línea negra discontinua indica el contorno de la célula. La línea blanca muestra las dimensiones del total de partículas intracelulares acopladas al antígeno.

- Este método no era aplicable a las partículas acopladas a antígenos de 1 µm, ya que eran demasiado pequeñas para contarlas con precisión. Para evaluar la cantidad de partículas de 1 µm acopladas al antígeno, se midió el volumen total de todas las partículas acopladas al antígeno fagocitadas y se volvió a calcular la cantidad de partículas individuales acopladas al antígeno basándose en el volumen total, suponiendo una densidad de empaquetamiento del 60 %. Este método demostró ser razonablemente preciso para las partículas acopladas a antígenos de 2,8 µm (9,1 partículas acopladas a antígenos/célula contadas manualmente frente a 11,9 partículas acopladas a antígenos/célula estimadas) y las partículas acopladas a antígenos de 4,5 µm (3,1 partículas acopladas a antígenos/célula contadas manualmente frente a 2,4 partículas acopladas a antígenos/célula estimadas) y, como tal, puede suponerse que también estima con precisión la cantidad de partículas acopladas a antígenos de 1 µm.

- La captación de partículas acopladas al antígeno se muestra en las Figuras 5B y 5C. La Figura 5B muestra el número de partículas acopladas al antígeno captadas por cada célula, evaluado mediante recuento manual (8 células contadas por tipo de microesfera). Utilizando el método de recuento manual, se observó que el número de partículas acopladas al antígeno fagocitadas por célula para las partículas acopladas al antígeno de 4,5 µm era de 3,1 (± 1,1). Para las partículas de 2,8 µm acopladas a antígeno fue de 9,1 (± 2,2). Con este método no fue posible contar el número de partículas de 1 µm acopladas al antígeno.

- La Figura 5C muestra el número de partículas acopladas al antígeno captadas por cada célula, evaluado mediante el cálculo del volumen (3 células medidas por tipo de microesfera) (*p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001, calculados usando la prueba de la T de Student). Utilizando el método de cálculo del volumen, se observó que el número de partículas acopladas al antígeno fagocitadas por célula para las partículas acopladas al antígeno de 4,5 µm era de 2,4 (± 1,1). Para las partículas de 2,8 µm acopladas a antígeno fue de 11,9 (± 3,2). Para las partículas de 1 µm acopladas a antígeno fue de 203,7 (± 21,9).

- Basándose en el número de partículas acopladas al antígeno captadas por cada célula, evaluado por el método de cálculo del volumen, se calculó la superficie total fagocitada y, por extensión, la cantidad total de antígeno. El área de superficie absorbida se calculó en 639,6 (± 68,9) µm² para las partículas de 1 µm acopladas al antígeno, 293,1 (± 79,3) µm² para las partículas acopladas a antígeno de 2,8 µm y 150,7 (± 67,0) µm² para las partículas acopladas a antígeno de 4,5 µm. Estos datos se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2:

Tamaño de las partículas fagocitables	Captación de partículas acopladas a antígeno por célula (contadas)	Absorción de partículas acopladas al antígeno por célula (calculada a partir del volumen)	Superficie captada por célula
1 µm	-	203,7 (± 21,9)	639,6 (± 68,9) µm ²
2,8 µm	9,1 (± 2,2)	11,9 (± 3,2)	293,1 (± 79,3) µm ²
4,5 µm	3,1 (± 1,1)	2,4 (± 1,1)	150,7 (± 67,0) µm ²

(iv) Evaluación de la estimulación de los linfocitos T

La capacidad de las partículas acopladas al antígeno para estimular los linfocitos T y, por tanto, promover su expansión se evaluó midiendo la liberación de IFN γ , IL22 e IL17A por las PBMC utilizando un ensayo FluoroSpot (Mabtech, Suecia). Las PBMC (250.000/pocillo) de donantes sanos sensibles al CMV (n = 2) se estimularon con las partículas acopladas al antígeno por triplicado. La concentración de partículas acopladas al antígeno se igualó, como se ha descrito anteriormente, en función de la superficie total: 10 partículas acopladas a antígeno de 1 μ m/célula, 1,4 partículas acopladas a antígeno de 2,8 μ m/célula y 0,5 partículas acopladas a antígeno de 4,5 μ m/célula.

Tabla 3:

Tamaño de las partículas fagocitables	Número de PBMC por pocillo	Número de monocitos por pocillo
1 μ m	250.000	50.000
2,8 μ m	250.000	50.000
4,5 μ m	250.000	50.000

Las células se incubaron durante 44 h a 37 °C, con CO $_2$ al 5 %. Las placas se revelaron siguiendo las instrucciones del fabricante y se leyeron en un lector FluoroSpot automatizado. Los datos comunicados para el FluoroSpot son los números de puntos cuando las células se estimulan con partículas acopladas a antígenos por encima de los números de puntos cuando no se estimulan con partículas acopladas a antígenos.

El nivel de producción de IFN γ , como se evalúa en el ensayo FluoroSpot, se muestra en la Figura 6A. Se observa que hay poca diferencia entre las partículas de antígeno.

El nivel de producción de IL22 e IL17, como se evalúa en el ensayo FluoroSpot, se muestra en las Figuras 6B y 6C. Se observa que las partículas acopladas a antígenos de 1 μ m provocaron una producción de IL22 e IL17 significativamente mayor en un individuo que las partículas acopladas a antígenos de mayor tamaño, con una tendencia similar observada para el otro individuo con respecto a IL22.

El nivel de producción de citocinas duales, como se evalúa en el ensayo FluoroSpot, se muestra en las Figuras 6D y 6E. Se observa que las partículas acopladas a antígeno de 1 μ m provocaron una liberación de citocinas duales (IFN γ +IL17 e IL22+IL17) significativamente mayor en un donante sano cuando se estimuló con las partículas acopladas a antígeno de 1 μ m que con las partículas acopladas a antígeno de mayor tamaño.

La liberación de citocinas en estos experimentos sirve como indicador de la expansión de los linfocitos T. En general, el IFN γ se produce por los linfocitos T CD4 $^{+}$ (subclase Th1) y los linfocitos T CD8 $^{+}$. Las IL17 e IL22 se producen principalmente por linfocitos T CD4 $^{+}$ Th17 proinflamatorios. Se ha demostrado que estas células proinflamatorias contribuyen a la erradicación de tumores. Los datos sugieren que las microesferas de 1 μ m activan y provocan la expansión de los linfocitos T CD4 $^{+}$ Th1 y los linfocitos T CD8 $^{+}$ en la misma medida que las otras microesferas, con la ventaja añadida de que también activa y provoca la expansión de linfocitos T CD4 $^{+}$ Th17 proinflamatorios adicionales y de los linfocitos T productores de citocinas duales, menos diferenciados pero aún proinflamatorios.

Ejemplo 4: estudio piloto

Se ha realizado un estudio piloto utilizando el método de la invención:

(i) Identificación de dianas neoantigénicas en el cáncer de vejiga urinaria

Los cánceres de vejiga urinaria presentan una elevada tasa de mutaciones, expresando así un gran número de neoantígenos que potencialmente podrían reconocerse como no propios por el sistema inmunitario. Como tales, los inventores investigaron polimorfismos tumorales adecuados como neoantígenos y dianas de linfocitos T mediante la minería de bases de datos de mutaciones que contienen grandes repositorios de posibles neoantígenos que pueden utilizarse para expandir los linfocitos T para inmunoterapia.

La base de datos COSMIC [27899578] contiene datos de mutaciones de 4754 carcinomas de células transicionales, tanto la secuenciación del exoma completo como los análisis de puntos calientes. Los inventores se centraron en el cáncer de vejiga urinaria (CBU) y seleccionaron las 15 mutaciones más frecuentes que dan lugar a un único cambio de aminoácido, calificándose así de neoantígeno. Los inventores también se centraron en los polimorfismos de genes que se sabe que están asociados a la patogénesis tumoral, como las cinasas, receptores de factores de crecimiento y proteínas del ciclo celular. Las 15 mutaciones seleccionadas cubren por sí solas el 73 % de las mutaciones del cáncer de vejiga encontradas en COSMIC. Los neopéptidos se diseñaron como el aminoácido mutado más diez aminoácidos flanqueantes al extremo carboxiloterminial y al extremo aminoterminial del mutado, dando lugar a un péptido de 21 aa. Para diseñar construcciones de neoantígenos, se recubrieron tres secuencias de neoantígenos con

dos espaciadores VVR, ya que el motivo VVR se escinde por la catepsina S en los lisosomas, después de la traducción, como una etapa en la presentación del antígeno leucocitario humano.

Como alternativa, se lleva a cabo la secuenciación del genoma completo de un tumor de un paciente con CBU con el fin de identificar polimorfismos adicionales y nuevas dianas para la inmunoterapia. Se puede llevar a cabo la secuenciación del ARN de los tumores para verificar la presencia de transcritos portadores de los polimorfismos. Las transiciones de espectrometría de masas con monitorización de reacciones múltiples (MRM) pueden utilizarse para explorar rápidamente a los pacientes en busca de la expresión de los neoantígenos más comunes a nivel proteico, adaptando los neoantígenos utilizados para la inmunoterapia individual.

(ii) Producción de neoantígenos recombinantes

Se ha desarrollado un protocolo muy eficaz para la producción de proteínas recombinantes. Se diseñan genes sintéticos, adquiridos y subclonados en vectores listos para su uso ajustados a diferentes condiciones de clonación y expresión. Los neoantígenos se expresan en *E. coli*, se purifican por cromatografía Ni-IMAC y se preparan para una presentación eficaz del antígeno mediante su acoplamiento a Dynabeads tras comprobar su pureza y sus niveles de endotoxinas. Con la plataforma metodológica establecida, la clonación y la expresión de proteínas recombinantes pueden ejecutarse en pocas semanas.

(iii) Activación y expansión de linfocitos T por neoantígenos

Se identificaron bioinformáticamente nueve neoantígenos, como se ha descrito anteriormente. Los neoantígenos diseñados se basaron en genes que albergan mutaciones asociadas al cáncer de vejiga urinaria, como FGFR3 y p53. En un experimento piloto en el que se utilizó una construcción compuesta por 3 neoantígenos, los inventores lograron identificar los linfocitos T productores de IFN- γ de la sangre de un paciente con cáncer de vejiga urinaria mediante FluoroSpot, demostrando la validez de la estrategia de neoantígeno.

Para el mismo paciente con cáncer de vejiga urinaria, la activación de los linfocitos T se realizó utilizando los péptidos neoantigénicos NA1-9 predichos. Se observó proliferación en respuesta a NA 1, 3, 5, 7 y 8. La Figura 2A muestra el número de células en el cultivo a lo largo del tiempo (SP = sangre periférica). La flecha de la Figura 2A indica el momento de la reestimulación (es decir, el momento en que la muestra de linfocitos T se puso en contacto con un segundo lote de células presentadoras de antígeno puestas en contacto con partículas fagocitables en condiciones que permiten la activación específica de los linfocitos T antitumorales en respuesta al antígeno presentado por la célula presentadora de antígenos). La Figura 2B muestra el % de linfocitos T CD4⁺/totales. La Figura 2C muestra la expresión de T-bet en CD4, y la Figura 2D, muestra la expresión de granzima B y perforina en linfocitos T CD8⁺.

Los linfocitos T expandidos expresan el factor de transcripción Tbet y altas concentraciones de las moléculas efectoras perforina y granzima B (GZB).

El método de la invención también se ha utilizado en células de un paciente con cáncer de colon diseminado del que se disponía de datos tumorales secuenciados. El paciente presentaba dos polimorfismos en p53, uno conocido y otro nuevo. El paciente también presentaba una mutación en PIK3CA. Se diseñó una construcción de neoantígeno tumoral, se expresó y se purificó, basándose en las mutaciones específicas de los datos tumorales del paciente. La construcción neoantigénica se utilizó para expandir células, dando lugar a una respuesta neoantígeno específica. Para el cultivo se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La Figura 3 muestra el porcentaje entre los linfocitos T (cuadrados pequeños) y el número total (cuadrados grandes) de linfocitos T CD4⁺, así como células CD4⁺ en proliferación (círculos) en la muestra T antes y durante la expansión. La Figura 4A muestra el número de células en el cultivo con el paso del tiempo (la línea roja muestra el péptido personalizado y las líneas rosa y naranja muestran los péptidos de predichos de los cultivos de control con la misma proteína, pero con las mutaciones predichas (NA1, 3, 4 y 5). La Figura 4B muestra el % de linfocitos T CD4⁺/totales. Las flechas de las Figuras 4A y 4B indican el momento de la reestimulación (es decir, el momento en que la muestra de linfocitos T se puso en contacto con un segundo lote de células presentadoras de antígeno puestas en contacto con partículas fagocitables en condiciones que permiten la activación específica de los linfocitos T antitumorales en respuesta al antígeno presentado por la célula presentadora de antígenos). La Figura 4C visualiza el análisis realizado con el algoritmo de inclusión de vecinos estocásticos de Barnes-Hut (BH-SNE, por sus siglas en inglés) para linfocitos T CD4, donde todas las células de las muestras se agrupan en un mapa en 2 dimensiones en función de la similitud en la intensidad de expresión según un conjunto de marcadores seleccionados, en este caso CD28, CD57, T-bet, GATA-3, perforina, granzima B (GZB), Ki-67 y PD-1.

La expresión del marcador de proliferación Ki67 y el número de linfocitos T aumentaron en la expansión, así como la expresión de marcadores importantes para la actividad antitumoral, tal como Tbet, perforina y granzima B, aumentaron en células tanto CD4⁺ como CD8⁺ a lo largo del periodo de cultivo de 14 días. El porcentaje de linfocitos T CD8⁺ disminuyó hasta aproximadamente un 10 % de los linfocitos T CD4⁺, pero el número total de células CD8⁺ aumentó.

Todo el proceso, desde la recepción de los datos de la secuencia hasta el análisis de las células expandidas, puede completarse en 4-5 semanas.

Estos resultados muestran que hubo una respuesta neoantigénica de Th1 adaptada. Por lo tanto, los inventores han demostrado que se pueden diseñar y utilizar neoantígenos predichos y de secuencia verificada para la activación y expansión de linfocitos T.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la expansión de linfocitos T antitumorales de un sujeto con cáncer, que comprende las etapas de:

- 5 a) proporcionar una partícula fagocitable, teniendo la partícula propiedades paramagnéticas y una o más construcciones neoantigénicas tumorales asociadas estrechamente a las mismas, en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con el cáncer en el sujeto, o una secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa del sujeto;
- 10 b) proporcionar una célula presentadora de antígenos viable;
- c) poner en contacto la partícula con la célula presentadora de antígenos *in vitro* en condiciones que permitan la fagocitosis de la partícula por la célula presentadora de antígenos;
- d) proporcionar una muestra de linfocitos T que comprende linfocitos T viables del sujeto;
- 15 e) poner en contacto la muestra de linfocitos T con la célula presentadora de antígenos contactada con la partícula *in vitro* en condiciones que permitan la activación específica y la expansión de linfocitos T antitumorales en respuesta al antígeno presentado por la célula presentadora de antígenos.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la partícula con la construcción de polipéptido asociada de la etapa (a) se ha sometido a un lavado esterilizante, dando como resultado una partícula aséptica con la construcción de polipéptido asociada y preferentemente, una partícula estéril con el polipéptido asociado.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el método comprende además:

- 25 (f) retirar de la partícula de la muestra de linfocitos T; y/o
- (g) retirar la partícula y la célula presentadora de antígenos de la muestra de linfocitos T.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la muestra de linfocitos T en las etapas d) a g) está libre de anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28.

30 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula presentadora de antígenos procede del sujeto.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende uno o más péptidos unidos covalentemente, en donde uno o más de los péptidos enlazados covalentemente comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con un cáncer en un sujeto, preferentemente la construcción neoantigénica tumoral comprende uno o más péptidos unidos covalentemente, en donde uno o más de los péptidos unidos covalentemente comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa en un sujeto.

40 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la construcción neoantigénica comprende tres o más péptidos unidos covalentemente (por ejemplo, tres, cuatro o cinco péptidos unidos covalentemente) y/o en donde cada péptido de la construcción neoantigénica tumoral comprende de 10 a 25 aminoácidos.

45 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dos o más construcciones neoantigénicas tumorales están estrechamente asociadas con la partícula y cada construcción neoantigénica tumoral puede tener la misma secuencia polipeptídica o puede tener diferentes secuencias polipeptídicas.

50 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los linfocitos T antitumorales expandidos en el método son linfocitos T CD4+ colaboradores y/o CD8+, y/o en donde la muestra de linfocitos T comprende linfocitos T CD4+ colaboradores y/o CD8+ y/o en donde la muestra de linfocitos T procede de un tumor, preferentemente un vaso linfático en un tumor.

55 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer es un cáncer sólido, por ejemplo, un cáncer seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (microcítico y no microcítico), tumor carcinoide pulmonar, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de vejiga urinaria.

60 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la partícula tiene una dimensión mayor de menos de 5,6 µm, preferentemente de menos de 4 µm, más preferentemente de menos de 3 µm, aún más preferentemente de 0,5 a 2 µm o lo más preferentemente, de aproximadamente 1 µm.

65 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en donde el lavado esterilizante o el lavado desnaturalizante implica someter la partícula con el polipéptido asociado a un pH elevado, tal como al menos pH 13, más preferentemente, al menos pH 14, lo más preferentemente, al menos pH 14,3; o en donde el lavado esterilizante consiste en someter la partícula con el polipéptido asociado a un pH bajo, por ejemplo, a menos de pH 2,

preferentemente, menos de pH 1 y/o

en donde el lavado esterilizante o el lavado desnaturalizante implica someter la partícula con el polipéptido asociado a una temperatura elevada, tal como al menos 90 °C, más preferentemente, al menos 92 °C, lo más preferentemente, a al menos 95 °C, y/o en donde el lavado esterilizante o el lavado desnaturalizante implica someter la partícula con el polipéptido asociado a un agentes esterilizante/desnaturalizante, tal como urea o clorhidrato de guanidina a una concentración suficiente, tal como al menos 5 M, 6 M, 7 M u 8 M.

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la partícula es una partícula polimérica, preferentemente una partícula de poliestireno.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una o más construcciones neoantigénicas tumorales están unidas covalentemente a la partícula.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula presentadora de antígenos y la muestra de linfocitos T proceden del mismo sujeto, y más preferentemente, proceden de la misma muestra de sangre, por ejemplo, la célula presentadora de antígenos y la muestra de linfocitos T proceden de una muestra de PBMC del mismo sujeto.

16. Una composición que comprende linfocitos T antitumorales de un sujeto con cáncer, en donde la composición comprende una mezcla de linfocitos T CD4+ colaboradores y CD8+ y se produce mediante un método que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una partícula fagocitable, teniendo la partícula propiedades paramagnéticas y una o más construcciones neoantigénicas tumorales asociadas estrechamente a las mismas, en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con el cáncer en el sujeto, o una secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa del sujeto;
- b) proporcionar una célula presentadora de antígenos viable;
- c) poner en contacto la partícula con la célula presentadora de antígenos *in vitro* en condiciones que permitan la fagocitosis de la partícula por la célula presentadora de antígenos;
- d) proporcionar una muestra de linfocitos T que comprende linfocitos T viables del sujeto;
- e) poner en contacto la muestra de linfocitos T con la célula presentadora de antígenos contactada con la partícula *in vitro* en condiciones que permitan la activación específica y la expansión de linfocitos T antitumorales en respuesta al antígeno presentado por la célula presentadora de antígenos.
- (f) retirar la partícula de la muestra de linfocitos T y/o retirar la partícula y la célula presentadora de antígenos de la muestra de linfocitos T;

en donde la muestra de linfocitos T de las etapas (d) a (f) está libre de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28.

17. La composición de la reivindicación 16 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que además comprende inmediatamente después de la etapa (e):

- a1) proporcionar una segunda partícula fagocitable, que tiene una o más construcciones neoantigénicas estrechamente asociadas con la misma, en donde la construcción neoantigénica tumoral comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido mutado que se sabe o se sospecha que está asociado con el cáncer en el sujeto, o una secuencia de aminoácidos mutada que se sabe o se sospecha que se expresa en una célula cancerosa del sujeto;
- b1) proporcionar una segunda célula presentadora de antígenos viable;
- c1) poner en contacto la segunda partícula con la segunda célula presentadora de antígenos *in vitro* en condiciones que permitan la fagocitosis de la partícula por la célula presentadora de antígenos; y
- e1) poner en contacto la muestra de linfocitos T con la segunda célula presentadora de antígenos puesta en contacto con la segunda partícula *in vitro* en condiciones que permitan la activación y expansión específicas de linfocitos T antitumorales en respuesta al antígeno presentado por la célula presentadora de antígenos; y

en donde preferentemente la segunda partícula fagocitable, que tiene una o más construcciones neoantigénicas estrechamente asociadas con la misma, de la etapa (a1) es la misma que la partícula fagocitable, que tiene una o más construcciones neoantigénicas estrechamente asociadas con la misma, de la etapa (a); y/o la segunda célula presentadora de antígenos viable de la etapa (b1) es la misma que la célula presentadora de antígenos viable de la etapa (b).

Figura 1

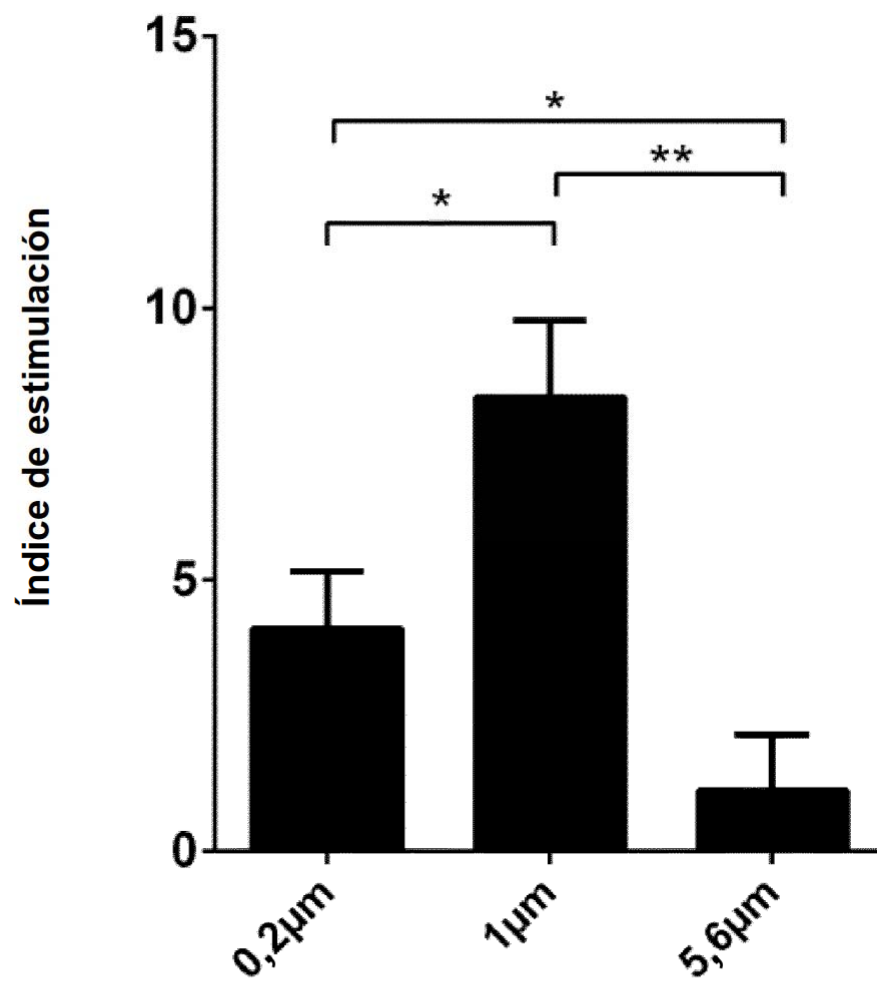
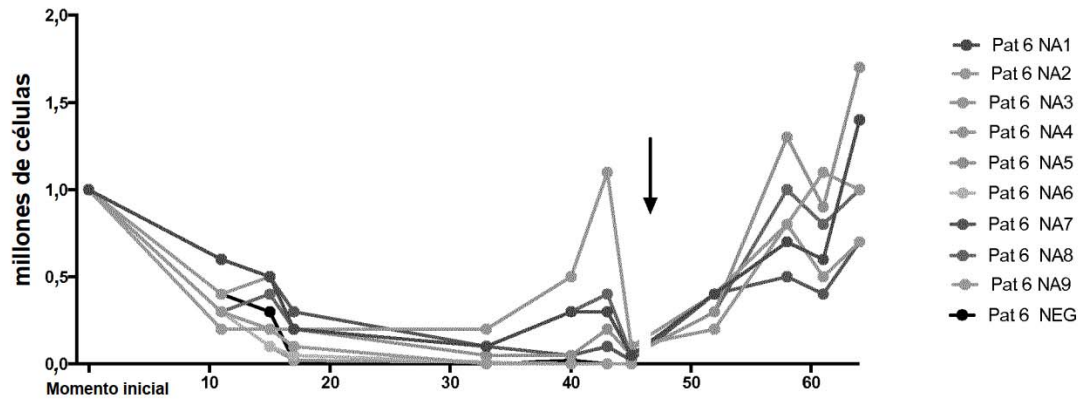
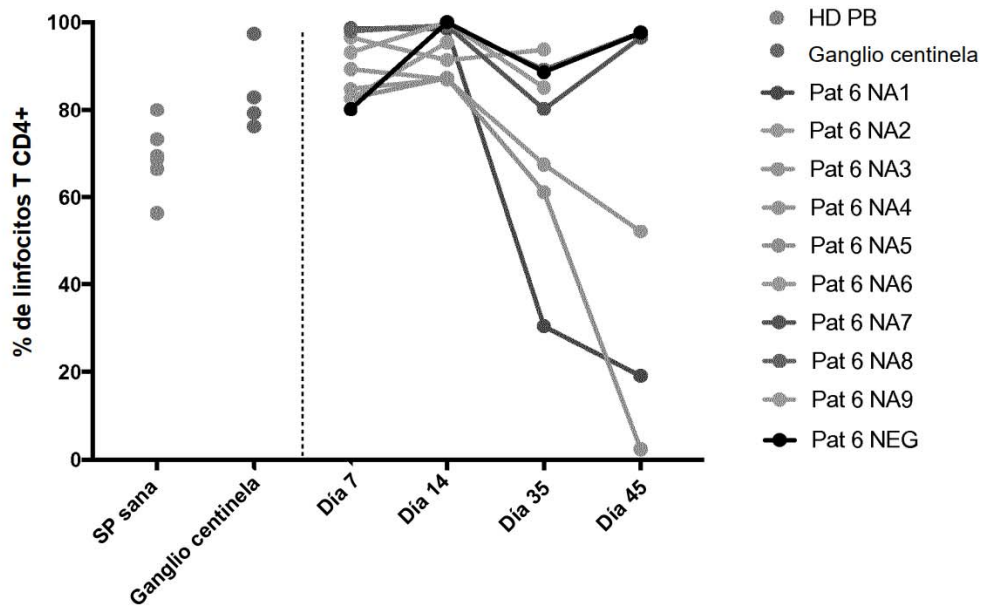


Figura 2

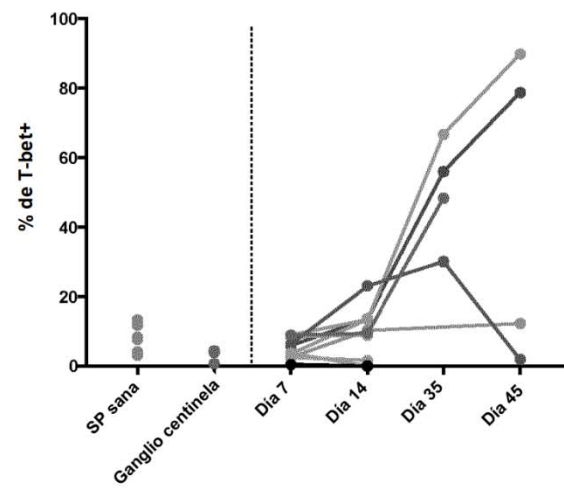
A



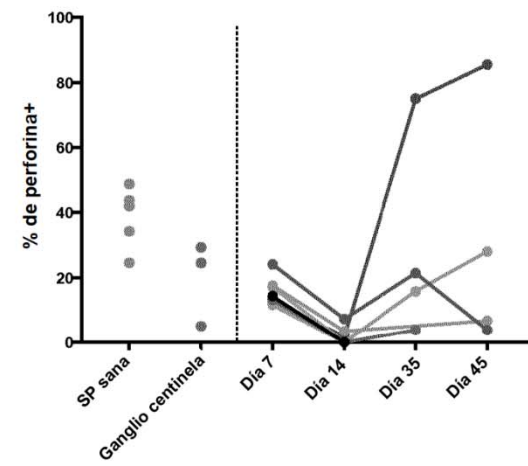
B



C



D



E

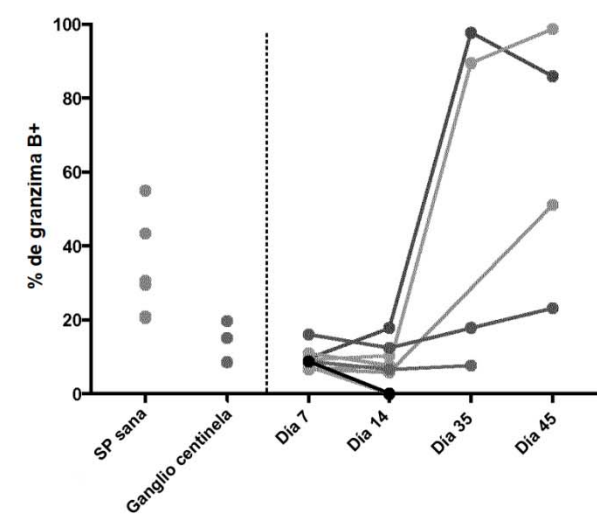


Figura 3

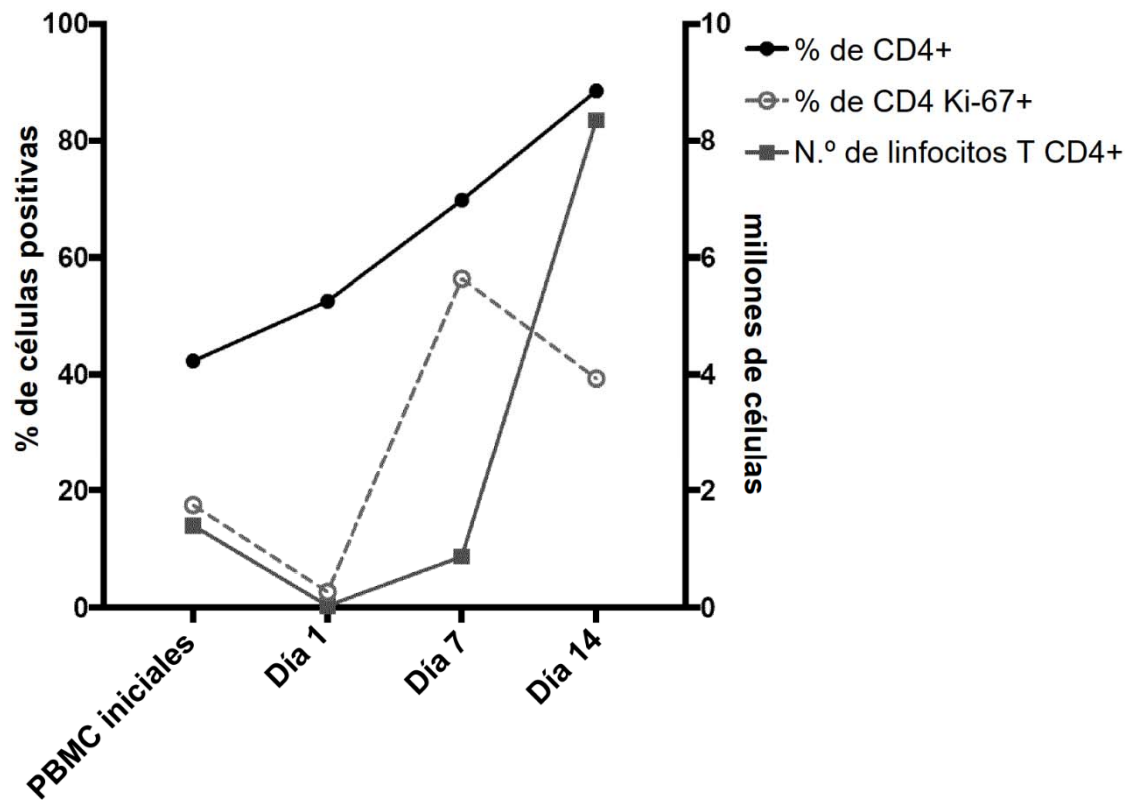
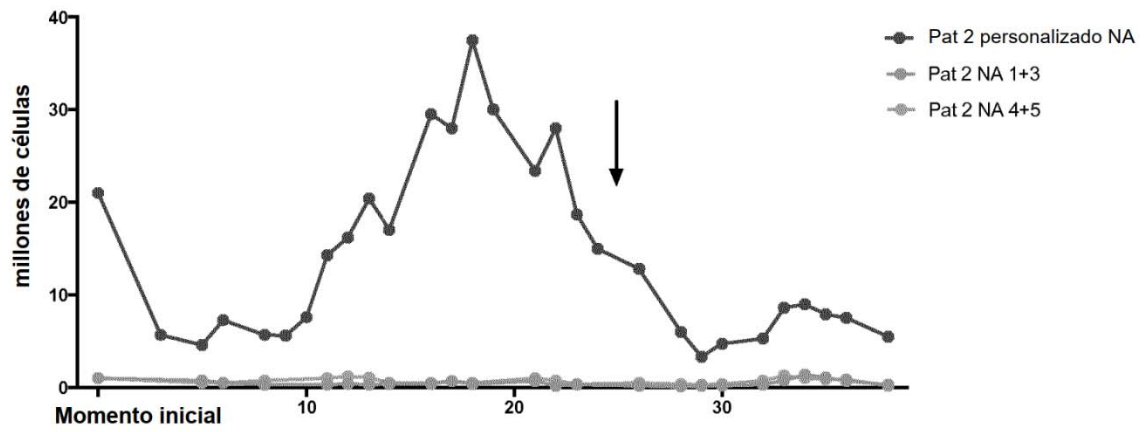
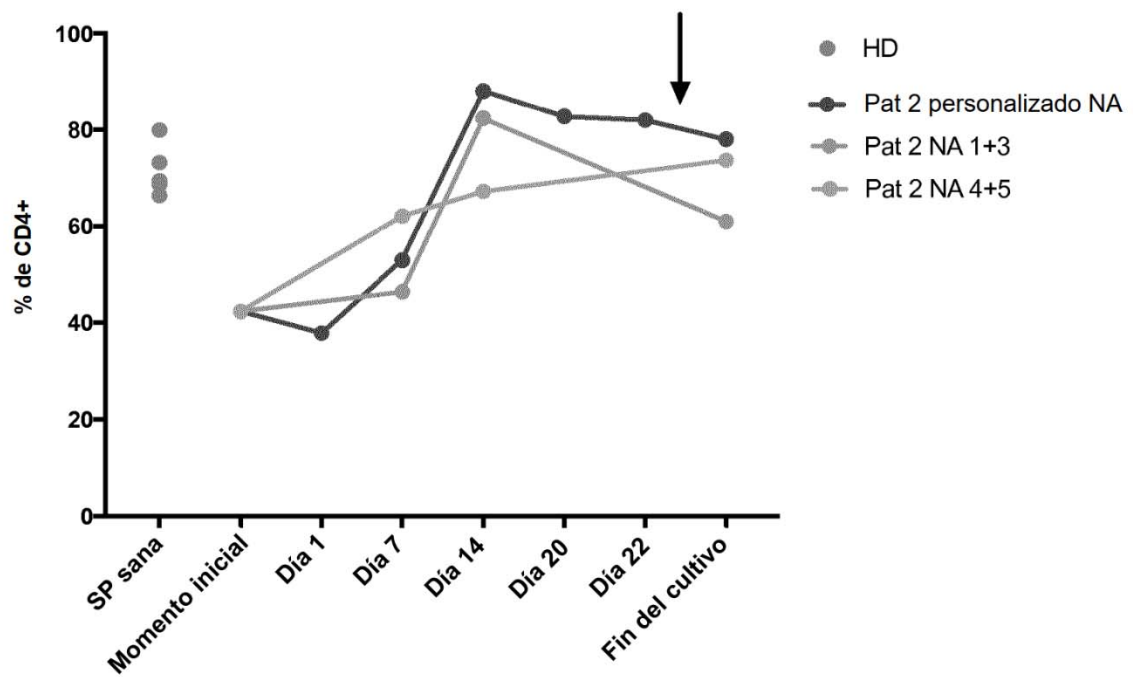


Figura 4

A

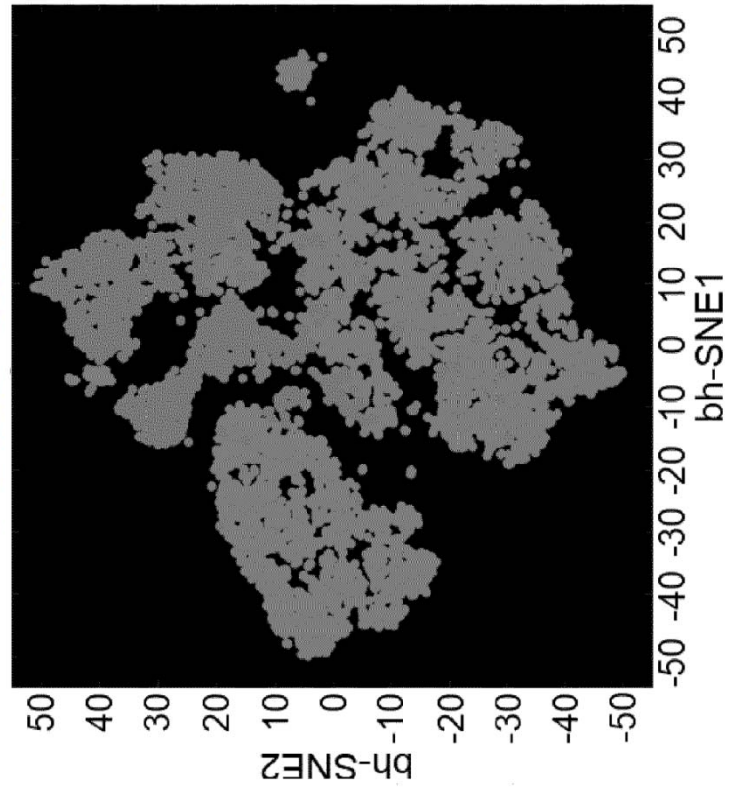


B

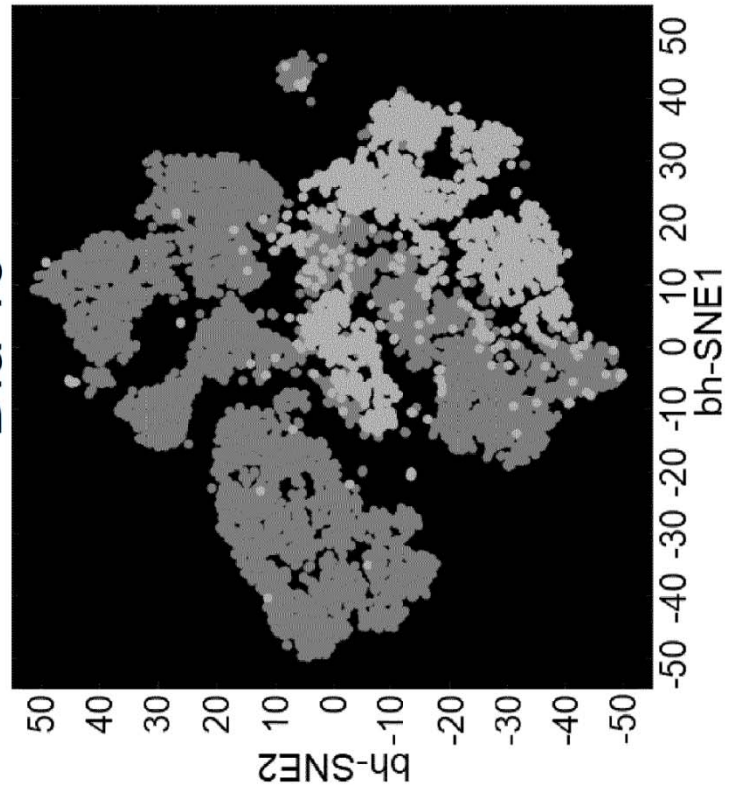


C (parte 1)

PBMC sanas

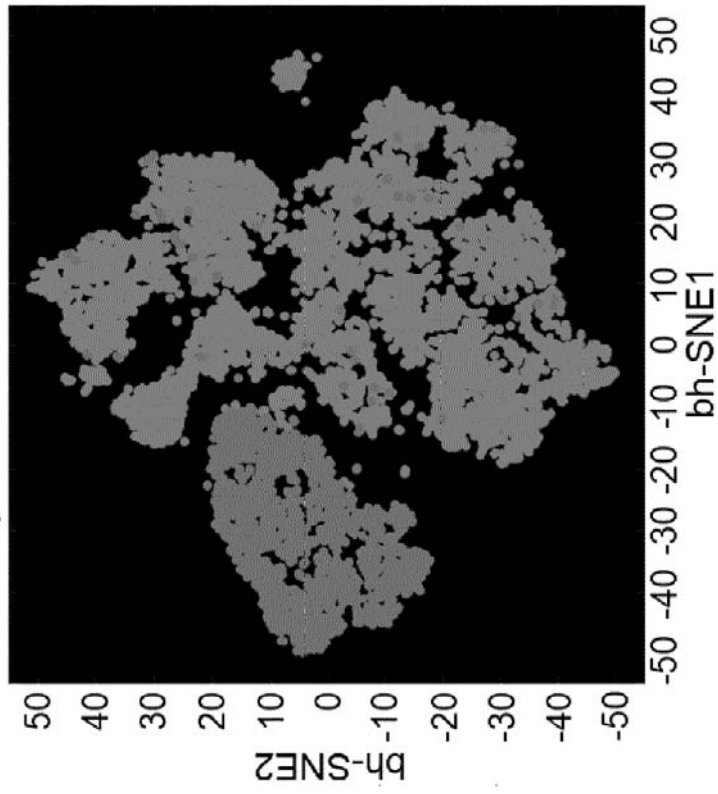


Día 15

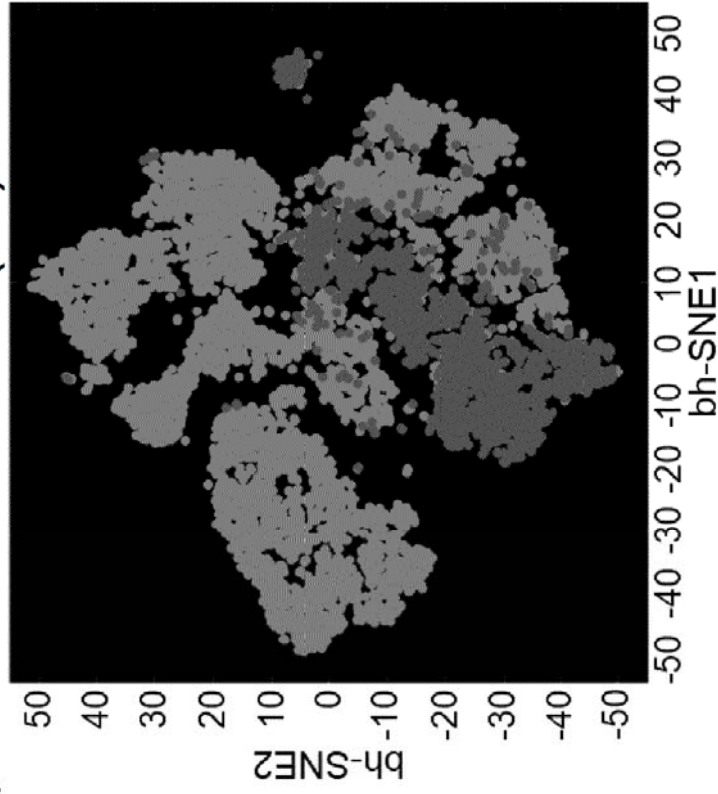


C (parte 2)

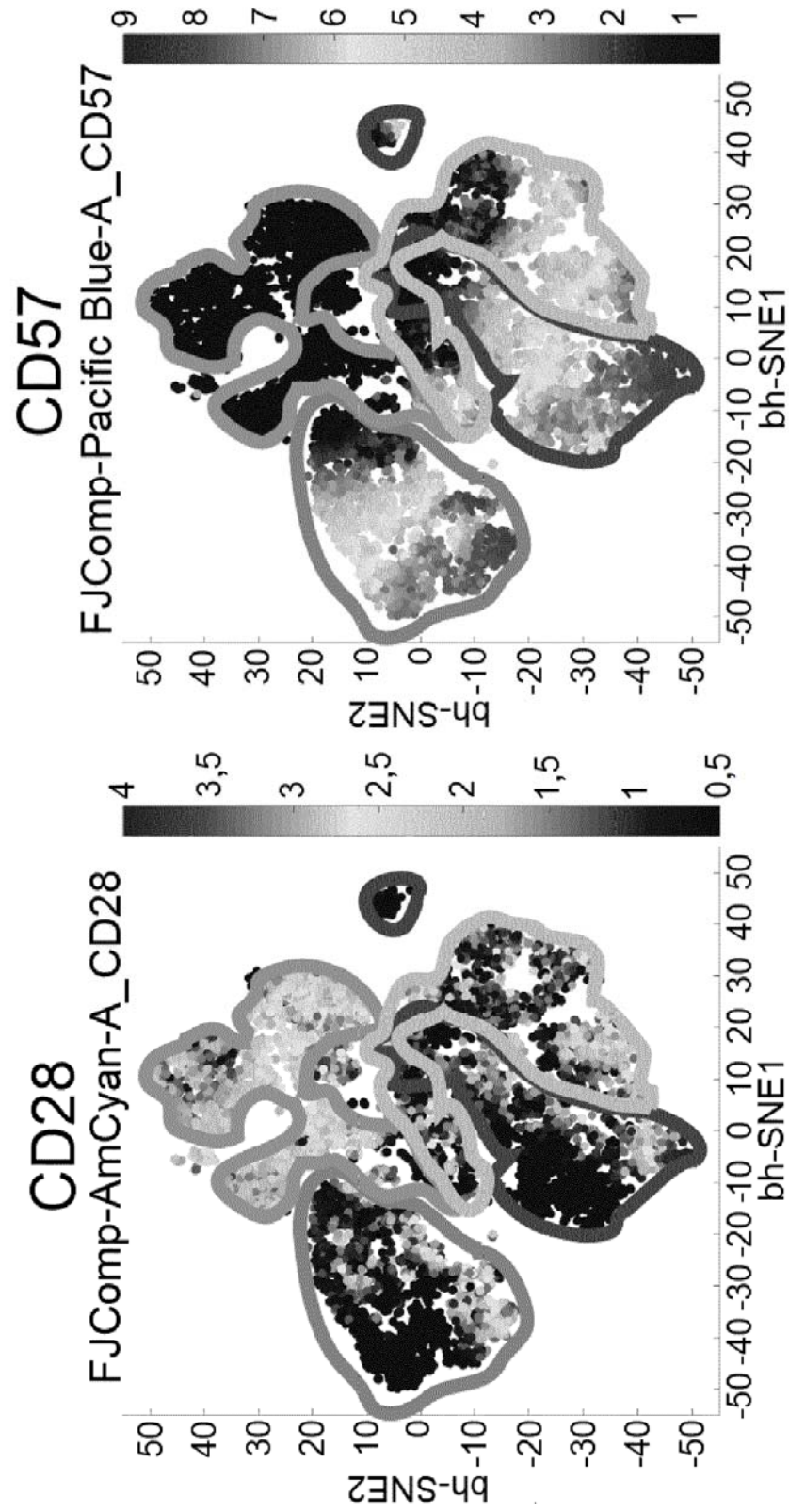
Día 20 (antes de la reestim.)



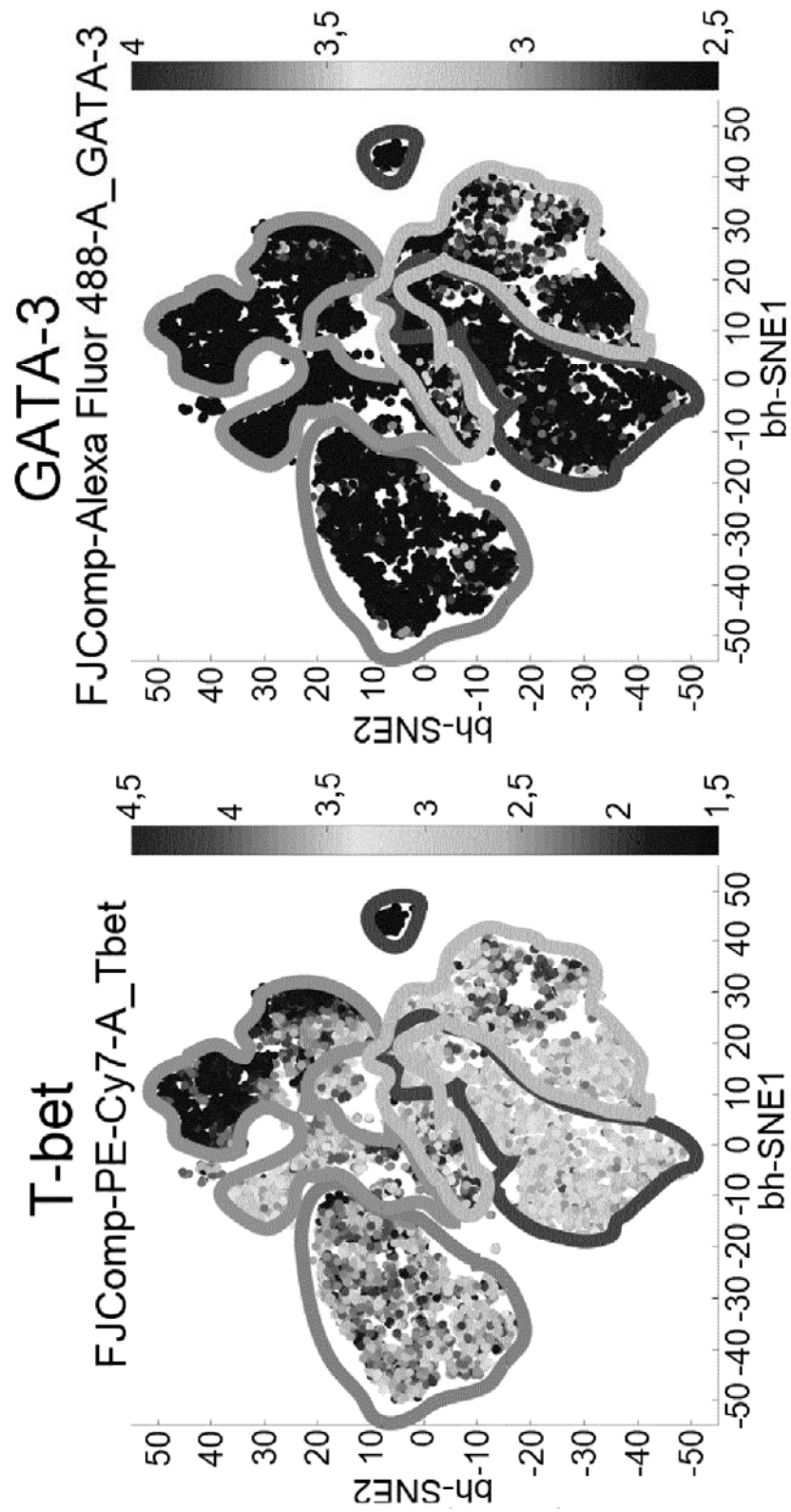
Día 36 (fin)



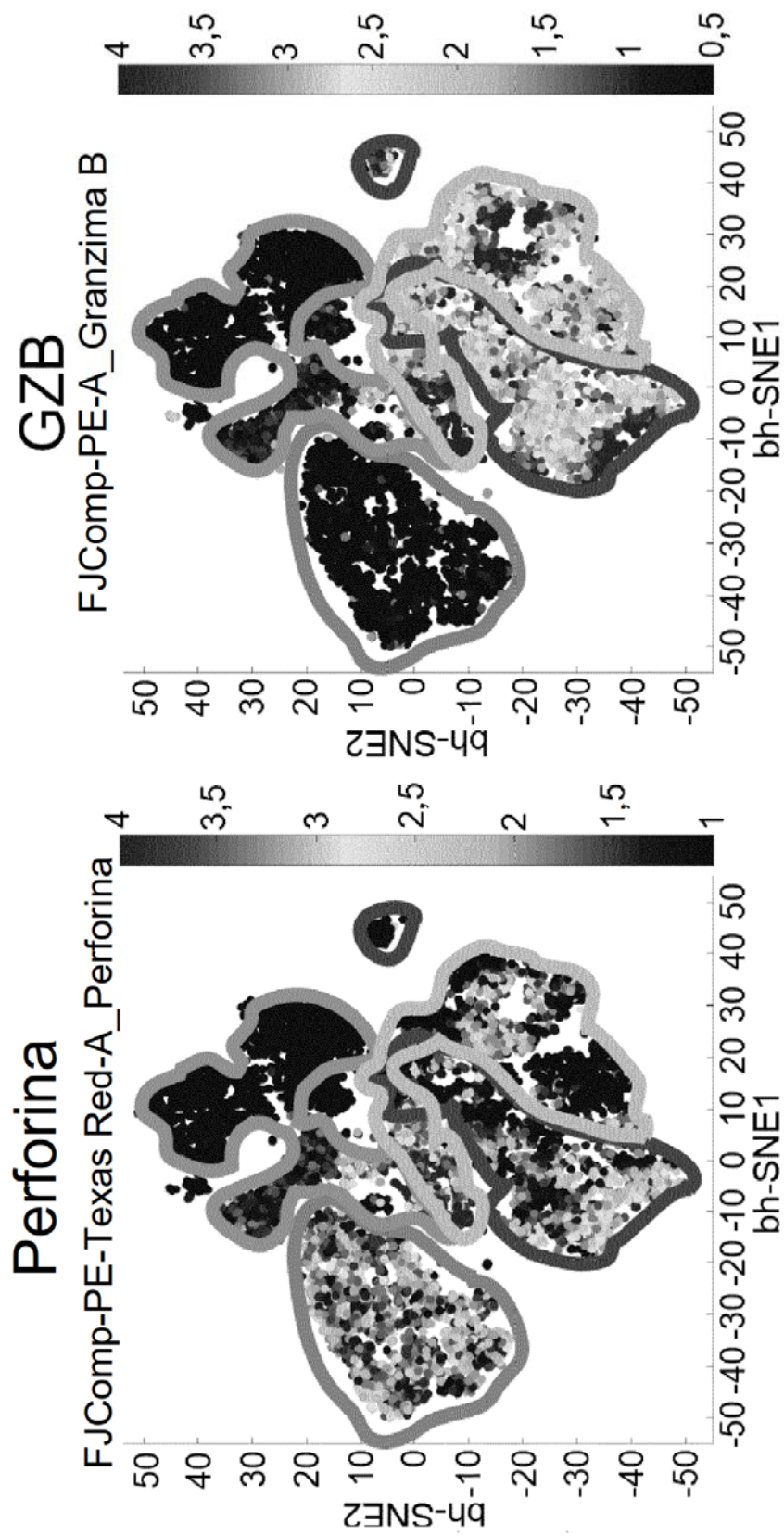
C (parte 3)



C (parte 4)



C (parte 5)



C (parte 6)

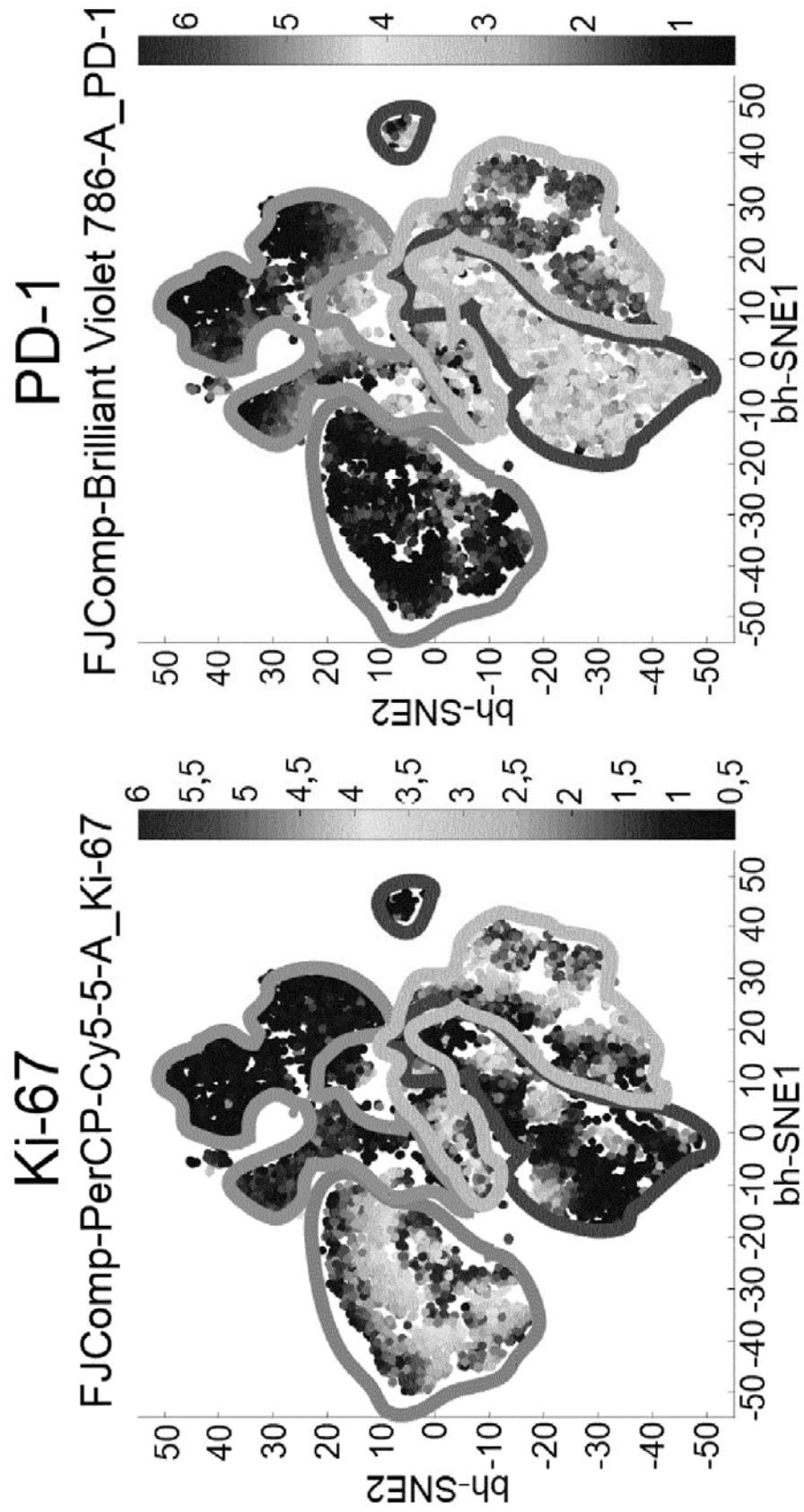
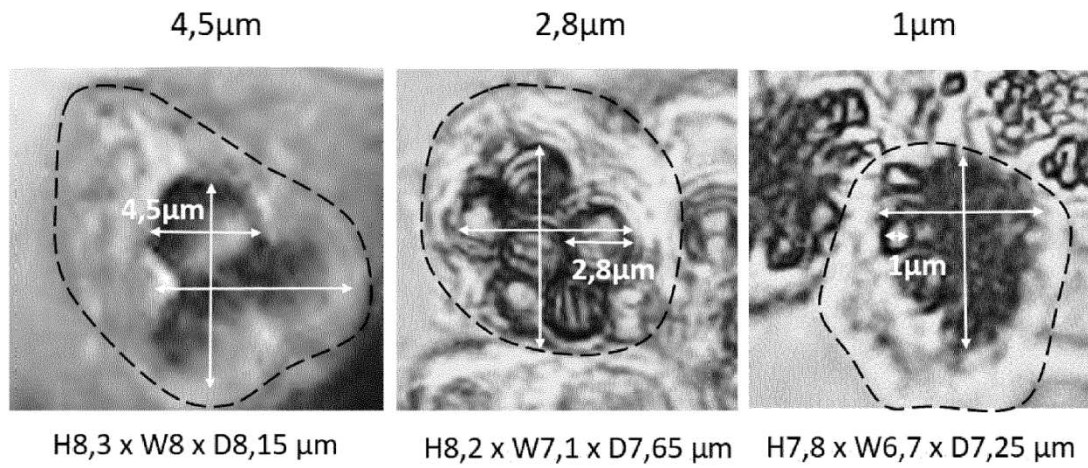


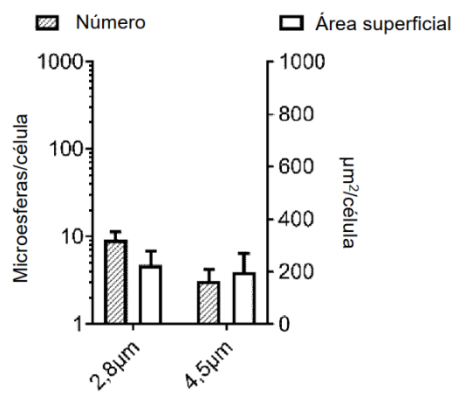
Figura 5

A



B

Captación de microesferas, contadas manualmente



C

Captación de microesferas, estimada

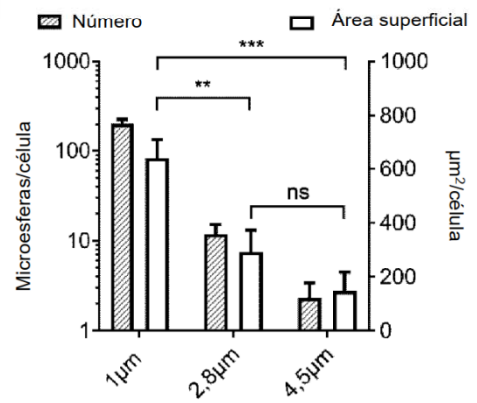
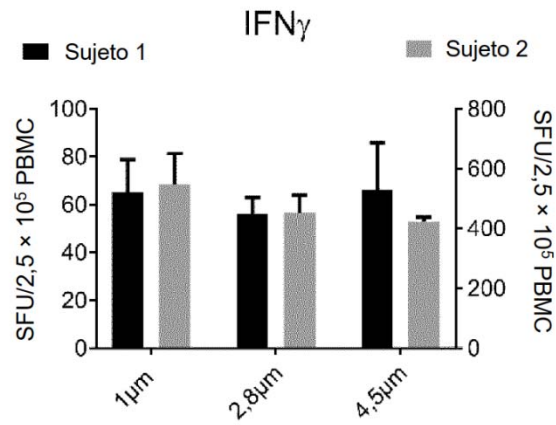
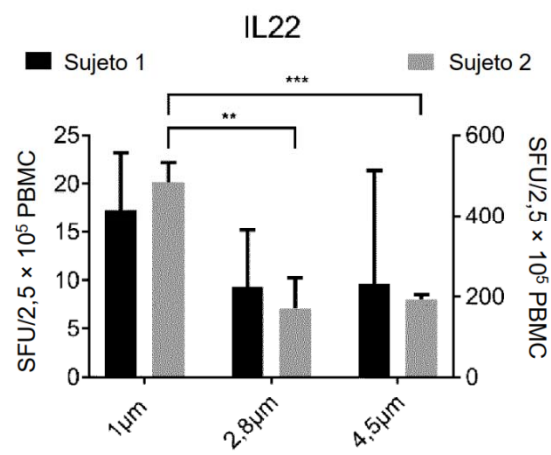


Figura 6

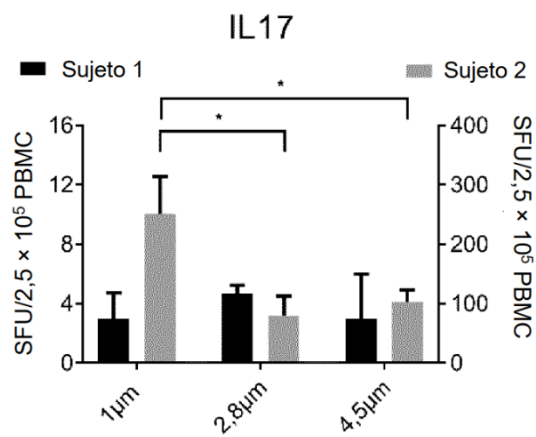
A



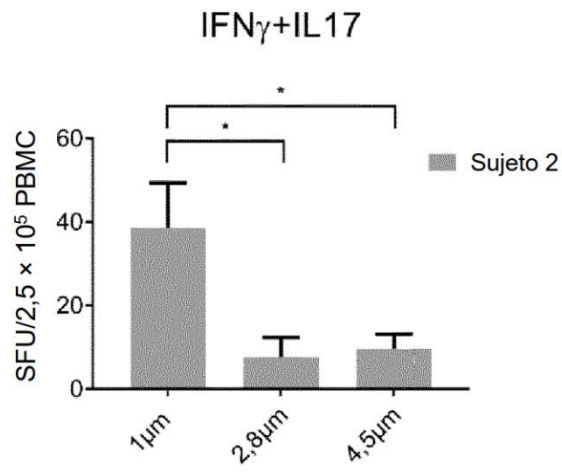
B



C



D



E

