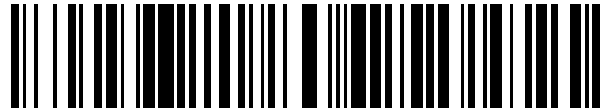


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 869 624**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17	(2015.01)
A61K 31/7068	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 35/02	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2015 PCT/CA2015/050780**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16023134**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2015 E 15832624 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021 EP 3180011**

54 Título: **Inmunoterapia para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

15.08.2014 US 201462037889 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITY HEALTH NETWORK (100.0%)
190 Elizabeth Street R. Fraser Elliott Building -
Room 1S-417
Toronto, Ontario M5G 2C4, CA**

72 Inventor/es:

**ZHANG, LI;
LEE, JONG BOK y
CHEN, BRANSON**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 869 624 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

Inmunoterapia para el tratamiento de cáncer

Campo de la invención

5 [0001] La divulgación se refiere al tratamiento de cáncer tal como leucemia y linfoma, incluida la leucemia mielógena aguda (LMA) usando linfocitos T doble negativos.

Antecedentes de la invención

10 [0002] La leucemia mielógena aguda (LMA) es la causa principal de la leucemia aguda en adultos y representa ~80% de toda la leucemia en adultos (Menzin *et al.*, 2002). A pesar de la extensa investigación realizada para desarrollar formas más eficaces de abordar la enfermedad, la LMA se asocia a una baja supervivencia a largo plazo; solo ~5% de los pacientes de edad avanzada y ~30% de los pacientes más jóvenes con LMA logran sobrevivir durante 5 años o más (Ungewickell y Medeiros, 2012; Hoand *et al.*, 2012). La quimioterapia antineoplásica convencional puede lograr efectivamente la remisión inicial de la enfermedad en >70% de los pacientes con LMA tratados (Ungewickell y Medeiros, 2012). Sin embargo, debido a la naturaleza altamente heterogénea de la enfermedad, ~30% de los pacientes con LMA no responden a la quimioterapia antineoplásica (Ungewickell y Medeiros, 2012; Bucisano *et al.*, 2012). Además, la quimioterapia antineoplásica no logra la remisión completa de la enfermedad en la mayoría de los pacientes, y más del 70% de los pacientes en remisión padecen una LMA recidivante dentro de los 2 años posteriores al tratamiento inicial (Ungewickell y Medeiros, 2012; Bucisano *et al.*, 2012). No existe un régimen de tratamiento estándar para los pacientes con LMA recidivante, que se asocia a un mal pronóstico (Ferrara *et al.*, 2004). La LMA recidivante es causada por un fenómeno llamado enfermedad mínima residual (EMR), en la que actúa como mediador una población celular de LMA con resistencia a la quimioterapia antineoplásica (Garces-Eisele, 2012; Lin y Levy, 2012). Se sabe que la EMR es en gran medida aportada por la población de células madre leucémicas (LSC, por sus siglas en inglés), ya que tiene la capacidad de soportar condiciones y entornos difíciles, como la quimioterapia antineoplásica (Ishikawa *et al.*, 2010; Kadowaki y Kitawaki, 2011; Vaz *et al.*, 2013). Por lo tanto, el desarrollo de tratamientos dirigidos a LMA-LSC y EMR para lograr la remisión sin recaídas de la enfermedad ha sido un área activa de investigación.

30 [0003] El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH alogénico) es un posible tratamiento curativo para pacientes con LMA y está asociado a tasas de supervivencia sin enfermedad más altas que la quimioterapia antineoplásica convencional (Alatrash y Mollidrem, 2009). Los efectos antileucémicos en los que actúan como mediadores linfocitos T derivados de donantes contribuyen al aumento de la supervivencia en los pacientes, ya que los injertos reducidos de linfocitos T dan como resultado tasas de recaída más altas (Alatrash y Mollidrem, 2009). Sin embargo, el uso de TCMH alogénico en la clínica está limitado por una escasez de donantes adecuados, la toxicidad del tratamiento y otras complicaciones asociadas (Alatrash y Mollidrem, 2009; Shlomchik, 2007). Se pueden inducir respuestas inmunitarias potentes en tejidos normales dando como resultado un daño tisular y, posiblemente, la muerte de los pacientes en casos severos (Alatrash y Mollidrem, 2009; Shlomchik, 2007) planteando así un obstáculo mayor que limita el uso de terapias celulares alogénicas.

40 [0004] Desde los primeros trabajos en la utilización de inmunoterapia de linfocitos T para tratar a pacientes con melanoma, se ha hecho un progreso significativo en la terapia adoptiva de linfocitos T para otros cánceres, que además avala el uso potencial de terapias celulares para lograr la remisión de LMA sin recaídas (Rosenberg *et al.*, 1988). Se han identificado antígenos que son aumentados en células leucémicas, antígenos asociados a leucemia (AAL), y se ha demostrado el efecto antileucémico de los linfocitos T específicos de AAL *in vitro* y en modelos animales (Vaz *et al.*, 2013; Teague y Kline, 2013). Sin embargo, el uso de linfocitos T específicos de AAL se ve obstaculizado por dificultades en el aislamiento y expansión de estas células (Kochenderfer *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2009; Parkhurst *et al.*, 2011; Robbins *et al.*, 2011). Además, aunque muchos AAL están sobreexpresados en LMA, la expresión de los antígenos en otros tejidos como el timo previene el desarrollo de linfocitos T maduros con receptores que tienen una alta avidéz con respecto a los AAL debido a la selección tímica de la especificidad de linfocitos T (Teague y Kline, 2013). Como alternativa, se ha intentado utilizar linfocitos T CD8+ transgénicos que expresan RLT transgénicos o un receptor de Ag. quimérico contra los AAL, tal como el antígeno tumoral de Wilms o Lewis Y., respectivamente (Peinert *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2010). Estos linfocitos T tienen una capacidad significativamente mayor de unirse a los AAL y muestran una excelente actividad antitumoral (Kochenderfer *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2009; Parkhurst *et al.*, 2011; Robbins *et al.*, 2011). Sin embargo, los posibles efectos secundarios asociados a la terapia génica, junto con procedimientos complicados y largos, imponen limitaciones en el uso de estas estrategias para tratar la LMA. Además, inyectar cantidades supra fisiológicas de linfocitos T modificados genéticamente puede conducir a acontecimientos adversos graves, incluida la muerte. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas inmunoterapias celulares con efectos potentes sobre una amplia gama de cánceres sin el requisito de identificar los AAL puede revolucionar la inmunoterapia contra la leucemia.

5 [0005] Los linfocitos T doble negativos (linfocitos T DN o TDN) son linfocitos T periféricos maduros que expresan el complejo RLT de CD3 pero no expresan marcadores de células CD4, CD8 o linfocitos T citolíticos naturales (NKT, por sus siglas en inglés) CD1d y J α 24-V α 14 cargados con alfa-galactosilceramida (α GalCer); representan 1~3% de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en humanos (Zhang *et al.*, 2000). Se han descrito protocolos para expandir los TDN de pacientes con LMA durante la remisión completa inducida por quimioterapia antineoplásica y se ha demostrado que los TDN de los pacientes con LMA tienen una actividad antileucémica significativa contra las células de LMA primaria obtenidas del mismo paciente *in vitro* (Young *et al.*, 2003; Merims *et al.*, 2011).

10 [0006] Anteriormente, se ha demostrado que los TDN inducen la destrucción de una línea celular de LMA alogénica dependiendo de la dosis a través de la vía dependiente de perforina-grancima (Merims *et al.*, 2011). En modelos animales, también se ha demostrado que, a diferencia de los linfocitos T CD4+ o CD8+ convencionales, la infusión de TDN alogénicos de ratón puede conferir una función inhibidora inmunitaria (Zhang *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2003; He *et al.*, 2007). Sin embargo, la actividad de los TDN con respecto a las células leucémicas primarias del paciente no se había estudiado *in vivo*.

15 Resumen de la invención

20 [0007] La presente invención se define por la combinación de una cantidad eficaz de linfocitos T doble negativos alogénicos maduros y un antineoplásico químico para su uso en el tratamiento de leucemia o linfoma según la reivindicación 1 adjunta. La invención también se define por la combinación de una cantidad eficaz de una primera dosis de linfocitos T doble negativos alogénicos maduros y una o más dosis separadas adicionales de una cantidad eficaz de TDN alogénicos maduros para su uso en el tratamiento de leucemia o linfoma según la reivindicación 2 adjunta.

25 [0008] En un aspecto de la divulgación, se ha determinado que los linfocitos T doble negativos (DN) (TDN) son eficaces para el tratamiento de cáncer tal como linfoma o leucemia. En particular, se ha demostrado que la inmunoterapia que usa los TDN es eficaz para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda (LMA), que incluye la destrucción de células leucémicas que son resistentes al tratamiento con quimioterapia antineoplásica. Opcionalmente, los TDN pueden ser autógenos, tales como los TDN de un sujeto con cáncer o sospechoso de tener cáncer, o alogénicos, tales como los TDN de un donante sano sin cáncer. Sorprendentemente, se observó que los TDN tienen un efecto citotóxico en células cancerosas *in vitro* e *in vivo* en modelos de xenoinjerto sin toxicidad detectable para células y tejidos normales.

30 [0009] Como se muestra en el Ejemplo 2, se ha demostrado que los TDN inyectados proliferan y persisten *in vivo* y migran a diferentes tejidos, incluyendo sangre, bazo y pulmón, y también se observaron poblaciones de TDN en pulmones, hígado y médula ósea, lo que sugiere que los TDN pueden dirigirse a tumores en estos órganos. Los inventores también han demostrado que los TDN alogénicos de donantes sanos se dirigen selectivamente a las células de LMA y exhiben una actividad destructora del cáncer. También se demostró que los TDN inhiben la incorporación de un injerto en un modelo de xenoinjerto de LMA, lo que demuestra que los TDN pueden reducir el nivel de células leucémicas *in vivo*. Además, como se muestra en el Ejemplo 6, los TDN inyectados migran de la sangre a la médula ósea y se dirigen a células cancerosas de LMA preexistentes, lo que sugiere que los TDN pueden ser eficaces en un entorno clínico para tratar sujetos con LMA.

40 [0010] También se demostró que varias líneas celulares de cáncer exhiben un alto nivel de sensibilidad a la citotoxicidad *in vitro* en la que linfocitos T DN actúan como mediadores, incluidas las líneas Daudi (linfoma linfocítico B (linfoma de Burkitt)), Jurkat (linfoma agudo de linfocitos T), K562 (leucemia mielógena crónica), U937 (leucemia mielógena crónica), así como líneas celulares de carcinoma broncopulmonar primarias y establecidas (datos no mostrados).

45 [0011] La quimioterapia antineoplásica es el tratamiento estándar utilizado para pacientes con LMA y puede ser eficaz para reducir la carga de leucemia y lograr la remisión inicial de la enfermedad. Sin embargo, la quimioterapia antineoplásica no suele lograr una remisión completa, lo que conduce a una alta tasa de recaída en pacientes con LMA. Por lo tanto, se espera que la capacidad de eliminar las células de LMA que no responden a la quimioterapia antineoplásica y reducir la tasa de recaída aumente significativamente la supervivencia de los pacientes con LMA. Tal como se muestra en el Ejemplo 7, los inventores han demostrado que los TDN son eficaces para destruir células cancerosas resistentes a la quimioterapia antineoplásica y, en particular LMA resistente a la quimioterapia antineoplásica. Por lo tanto, los TDN pueden ser útiles para la inmunoterapia en sujetos que no responden a la quimioterapia antineoplásica o para prevenir o tratar casos de cánceres recidivantes o recurrentes tales como LMA y/o enfermedad mínima resistente (EMR) resistente a la quimioterapia antineoplásica.

55 [0012] En otro aspecto de la divulgación, se ha demostrado que los TDN son eficaces para destruir células cancerosas en combinación con un inhibidor del ciclo celular. Como se muestra en el Ejemplo 9, la terapia

combinada usando TDN y el inhibidor del ciclo celular ara-C redujo el nivel de incorporación del injerto de LMA en relación con el tratamiento solo con ara-C.

[0013] Como se establece en el Ejemplo 10, los TDN alogénicos tienen un potente efecto antileucémico contra hemoblastos de pacientes con LMA primaria, que incluyen células cancerosas resistentes a la quimioterapia antineoplásica *in vitro* y en modelos de xenoinjerto sin toxicidad detectable para células y tejidos normales. No se observó que los TDN alogénicos atacaran células mononucleares de sangre periférica (CMSP) o células madre/progenitoras hematopoyéticas normales, ni causaran una enfermedad xenogénica del injerto contra el huésped en ratones.

[0014] En consecuencia, en un ejemplo se proporciona un uso médico del tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de TDN como se describe en la presente memoria. También se proporciona el uso de TDN como se describe en la presente memoria para el tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita. En un caso, que es una forma de realización de la invención, el cáncer es leucemia. En una forma de realización preferida, el cáncer es leucemia mielógena aguda (LMA). En una forma de realización, el cáncer es leucemia mielógena crónica (LMC). En un caso, que es una forma de realización de la invención, el cáncer es linfoma. En una forma de realización, el cáncer es linfoma no hodgkiniano (LNH). En una forma de realización, el cáncer es linfoma linfocítico B, tal como linfoma de Burkitt. En una forma de realización, el cáncer es linfoma agudo de linfocitos T. En un caso, el cáncer es carcinoma broncopulmonar.

[0015] En una forma de realización, el cáncer es resistente al tratamiento con quimioterapia antineoplásica. Por ejemplo, en una forma de realización, el cáncer es LMA resistente a la quimioterapia antineoplásica. En una forma de realización, los usos descritos en la presente memoria son para el tratamiento de un sujeto con cáncer recurrente o recidivante. En una forma de realización, el cáncer es leucemia o linfoma recurrente, recidivante o refractario. En una forma de realización, el cáncer es cáncer recidivante tal como LMA recidivante causado por una enfermedad mínima residual (EMR) o células madre leucémicas. En una forma de realización, el sujeto no está en remisión completa. Por ejemplo, en una forma de realización, el sujeto tiene una o más células cancerosas detectables, opcionalmente una o más células leucémicas o de linfoma detectables. En una forma de realización, el sujeto se ha sometido previamente a tratamiento quimioterapéutico para el cáncer, pero las células cancerosas no responden al tratamiento de quimioterapia antineoplásica (es decir, cáncer refractario). En una forma de realización, el sujeto se ha sometido previamente a tratamiento quimioterapéutico para el cáncer y tiene una o más células cancerosas detectables. En una forma de realización, el sujeto no se ha sometido previamente a tratamiento quimioterapéutico para el cáncer. En una forma de realización, los TDN son para uso o administración en un sujeto que tiene cáncer o se sospecha que tiene cáncer y que no se somete a quimioterapia antineoplásica.

[0016] Además, se proporciona un método *in vitro* y un uso médico para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas que comprende poner en contacto las células cancerosas con uno o más TDN. También se proporciona el uso de TDN como se describe en la presente memoria para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas. Opcionalmente, las células cancerosas están *in vivo* o *in vitro*. En un caso que corresponde a una forma de realización de la invención, las células cancerosas son células leucémicas. En una forma de realización preferida, las células cancerosas son células de LMA. En una forma de realización, las células cancerosas son células de linfoma. En una forma de realización, las células cancerosas son células resistentes al tratamiento con quimioterapia antineoplásica. Por ejemplo, en una forma de realización, las células cancerosas son células de LMA que son resistentes al tratamiento con un inhibidor del ciclo celular tal como ara-C. En una forma de realización, las células cancerosas son células madre cancerosas, tales como células madre leucémicas.

[0017] Los TDN descritos en la presente memoria pueden ser fácilmente obtenidos por un experto en la técnica y se distinguen fácilmente de otros tipos de linfocitos T. En una forma de realización, los TDN no expresan CD4 ni CD8. En una forma de realización, los TDN expresan el complejo RLT de CD3 y no expresan CD4 ni CD8. En una forma de realización, los TDN tienen el fenotipo CD3+, RLT+ $\gamma\delta$ o RLT+ $\alpha\beta$, CD4-, CD8-, α -Gal-, PD-1-, CTLA4-. En una forma de realización, los TDN tienen el fenotipo CD3+, RLT+ $\gamma\delta$ o RLT+ $\alpha\beta$, CD4-, CD8-, α -Gal-, PD-1-, CTLA4-, CD44+, CD28-. En una forma de realización, los TDN tienen el fenotipo CD3+, CD4-, CD8-, α -Gal-, PD-1-, CTLA4-, CD44+. En una forma de realización, los TDN tienen el fenotipo CD3+, CD4-, CD8-, α -Gal-, $\text{J}\alpha 24$ -, $\text{V}\alpha 14$ -, CD44+, PD-1-, CTLA4-, CD45Ro+. En una forma de realización, los TDN se pueden obtener de una muestra que comprenda células mononucleares de sangre periférica (CMSP). En una forma de realización, la muestra es una muestra de sangre. Opcionalmente, la muestra es de un donante sano o de un sujeto con cáncer o sospechoso de tener cáncer y los TDN se utilizan para tratar al sujeto.

[0018] Opcionalmente, los linfocitos T DN pueden expandirse *in vitro* o *ex vivo* antes de su administración o uso para el tratamiento de cáncer como se describe en la presente memoria. En una forma de realización, los TDN se formulan para su uso o se administran al sujeto mediante inyección intravenosa.

[0019] En una forma de realización, los TDN son TDN autógenos obtenidos de un sujeto, tal como un sujeto con cáncer o sospechoso de tener cáncer. En una forma de realización, los TDN son de un sujeto con una o más células cancerosas detectables, opcionalmente una o más células leucémicas o de linfoma. En una forma de realización, los

TDN son de un sujeto que ha sido tratado de cáncer previamente. En una forma de realización, los TDN son de un sujeto en remisión completa. En una forma de realización, los TDN son de un sujeto que no está en remisión completa. En una forma de realización, los TDN se obtienen del sujeto antes, durante o después de la quimioterapia antineoplásica. Por ejemplo, los TDN se pueden obtener de un sujeto antes de comenzar un ciclo de quimioterapia antineoplásica, después de un primer ciclo de quimioterapia antineoplásica, entre ciclos de quimioterapia antineoplásica o después de uno o más ciclos de quimioterapia antineoplásica. En una forma de realización, los TDN se obtienen del sujeto el mismo día, 3 días después, 1 semana después, 2 semanas después, 3 semanas después o 1 mes después de la administración de un antineoplásico químico al sujeto.

[0020] En una forma de realización, los TDN son alogénicos, tales como TDN obtenidos de uno o más sujetos sin cáncer. En una forma de realización, los 5 TDN se obtienen de uno o más donantes sanos.

[0021] En una forma de realización, los TDN son para uso o administración a un sujeto para el tratamiento de cáncer, tal como para el tratamiento de leucemia o linfoma. En una forma de realización, los TDN son para uso o administración a un sujeto que no está sometido a quimioterapia antineoplásica. En otra forma de realización, los TDN son para uso o administración a un sujeto antes, durante o después de la quimioterapia antineoplásica. Por ejemplo, los TDN pueden ser para uso o administración a un sujeto antes de comenzar un ciclo de quimioterapia antineoplásica, después de un primer ciclo de quimioterapia antineoplásica, entre ciclos de quimioterapia antineoplásica o después de uno o más ciclos de quimioterapia antineoplásica. En una forma de realización, los TDN se administran al sujeto 5 el mismo día, 3 días después, 1 semana después, 2 semanas después, 3 semanas después o 1 mes después de la quimioterapia antineoplásica. En una forma de realización, la quimioterapia antineoplásica comprende el uso o administración de uno o más antineoplásicos químicos, tales como inhibidores del ciclo celular como se describe en la presente memoria.

[0022] Opcionalmente, se pueden administrar o utilizar dos o más dosis separadas de TDN para el tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita. Por ejemplo, en una forma de realización, los métodos y usos descritos en la presente memoria incluyen una primera dosis de TDN y al menos una dosis adicional de TDN. En una forma de realización, la al menos una dosis adicional es para uso o administración al menos 3 días después de la última dosis de TDN, al menos 5 días después de la última dosis de TDN u, opcionalmente, entre 3 días y dos semanas después de la última dosis de TDN. En una forma de realización, las dos o más dosis separadas son para su administración o uso antes, durante o después de la quimioterapia antineoplásica.

[0023] En una forma de realización, los TDN son células recombinantes que se han modificado para expresar una o más proteínas exógenas. Por ejemplo, en una forma de realización, los TDN descritos en la presente memoria expresan un receptor con una alta avidéz hacia un biomarcador de cáncer, tal como una proteína expresada en la superficie de una célula cancerosa. En una forma de realización, los TDN expresan un receptor quimérico para el antígeno (CAR) que se une preferiblemente a una célula cancerosa, tal como una célula leucémica. Por ejemplo, en una forma de realización, los TDN descritos en la presente memoria expresan uno o más receptores que se unen a CD33, CD19, CD20, CD123 y/o LeY.

[0024] En una forma de realización, los TDN destruyen y/o inhiben preferiblemente la proliferación de células cancerosas con relación a las células normales. En una forma de realización, los TDN destruyen y/o inhiben preferiblemente la proliferación de células leucémicas con relación a las células normales. Por ejemplo, en una forma de realización, los TDN destruyen y/o inhiben preferiblemente la proliferación de hemoblastos de LMA con relación a otras células hematopoyéticas o células mononucleares de sangre periférica (CMSP). En una forma de realización, los TDN destruyen y/o inhiben preferiblemente la proliferación de células madre leucémicas con relación a las células madre hematopoyéticas normales.

[0025] En otra forma de realización, los TDN no provocan una respuesta inmunitaria alogénica cuando se usan o administran a un sujeto para el tratamiento de cáncer.

[0026] Los inventores han determinado que la terapia combinada que utiliza TDN y un antineoplásico químico, tal como un inhibidor del ciclo celular, es sorprendentemente eficaz para destruir células cancerosas y en particular LMA. En consecuencia, en una forma de realización se proporciona un uso médico para el tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de TDN y un antineoplásico químico. También se proporciona el uso de una cantidad eficaz de TDN y un antineoplásico químico para el tratamiento de cáncer. En una forma de realización, el antineoplásico químico es un inhibidor del ciclo celular. En una forma de realización, el inhibidor del ciclo celular es un inhibidor de síntesis de ADN. Opcionalmente, los TDN y el antineoplásico químico se administran al sujeto en diferentes momentos o al mismo tiempo.

[0027] En una forma de realización, el antineoplásico químico es un inhibidor del ciclo celular. En una forma de realización, el inhibidor del ciclo celular es un fármaco de quimioterapia antineoplásica dependiente del ciclo celular. Inhibidores del ciclo celular incluyen, aunque no de modo taxativo, doxorrubicina, melfalán, roscovitina, mitomicina C, hidroxycarbamida, 50-fluorouracilo, cisplatino, ara-C, etopósido, gemcitabina, bortezomib, sunitinib, sorafenib,

ácido valproico, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC, por sus siglas en inglés) o dacarbazina. Ejemplos de inhibidores de HDAC incluyen, aunque no de modo taxativo, FR01228, Trichostatina A, ácido suberoilánidido hidroxámico (SAHA, por sus siglas en inglés) y PDX101.

5 [0028] También se proporciona un uso médico en el tratamiento de la leucemia mielógena aguda (LMA) en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de TDN y un antineoplásico químico. En una forma de realización, el antineoplásico químico es un inhibidor del ciclo celular. En una forma de realización, el inhibidor del ciclo celular es ara-C. En una forma de realización, el sujeto tiene LMA recurrente o recidivante, tal como LMA recurrente o recidivante causada por una enfermedad mínima residual (EMR). En una forma de realización, el sujeto tiene leucemia refractaria a la quimioterapia antineoplásica.

10 [0029] Además, se proporciona una composición que comprende TDN y un antineoplásico químico. En una forma de realización, el antineoplásico químico es un inhibidor del ciclo celular. En una forma de realización, el inhibidor del ciclo celular es ara-C. Opcionalmente, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, también se proporciona el uso de una composición que comprende TDN y un antineoplásico químico para el tratamiento de cáncer. En una forma de realización, la composición es para el tratamiento de LMA. En una forma de realización, la composición es para el tratamiento de LMA resistente a la quimioterapia antineoplásica con un antineoplásico químico solo.

[0030] Se deducirán otras características y ventajas de la presente divulgación a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican formas de realización preferidas de la divulgación, se dan solamente a modo ilustrativo.

20 Breve descripción de los dibujos

[0031] A continuación se describirán una o más formas de realización de la divulgación en relación con los dibujos en los que:

25 La Figura 1a muestra la expansión de los TDN de sangre periférica de pacientes con LMA y voluntarios sanos y que los TDN se pueden expandir *ex vivo* e *in vitro*. Se determinó el número de TDN expandidos de 36 y 7 cultivos de expansión de TDN de 20 ml de SP de 24 pacientes en remisión y 7 voluntarios sanos, respectivamente. La Figura 1b muestra la proliferación y la Figura 1c la migración de TDN de voluntarios sanos expandido *ex vivo* en un modelo de ratón NSG. 2×10^7 TDN marcados con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, por sus siglas en inglés) inyectados por vía intravenosa en ratones NSG con 10^5 UI de suplemento de IL-2 inyectado por vía intraperitoneal los días 0, 2, 3 y 7. La Figura 1b muestra un gráfico representativo de cambio en la fluorescencia de CFSE de células CD45+ humanas en el bazo medido el día 2, 7, 10 y 14 después de la inyección. La Figura 1c muestra la frecuencia y el número de células humanas extraídas de la sangre, el bazo, la médula ósea, el hígado y el pulmón (n=3). El número del valor medio y el EEM (error estándar de la media) y la barra de error representan el EEM de cada grupo. (** $p < 0,001$).

35 La Figura 2a muestra gráficas representativas de un ensayo de destrucción basado en flujo recientemente desarrollado para determinar la sensibilidad *in vitro* de las muestras de LMA primaria a la citotoxicidad en la que linfocitos T DN actúan como mediadores. El ensayo se llevó a cabo con una muestra de LMA primaria, 090596, y CMSP normal de un donante sano en diferentes relaciones efector a objetivo. Se utilizó fluorescencia de anexina V para determinar el nivel de apoptosis después del cocultivo. La Figura 2b muestra los resultados del ensayo de destrucción basado en flujo llevado a cabo contra células sanas y leucémicas usando TDN alogénicos. Ensayo de destrucción basado en flujo llevado a cabo con TDN alogénicos expandidos a partir de tres donantes sanos (DS) contra diferentes objetivos: LMA (lleno), LMA3y dos hemoblastos de pacientes con LMA primaria, y CMSP y células madre y progenitoras hematopoyéticas (CMH) obtenidas de tres donantes sanos (abierto) para determinar el porcentaje de destrucción específica. Cada gráfica representa el promedio de tres ensayos de destrucción llevados a cabo y las barras de error representan el EEM.

45 La Figura 3a muestra los resultados de la selección de hemoblastos de LMA del paciente para la sensibilidad a la citotoxicidad *in vitro* en la que linfocitos T DN actúan como mediadores y demuestra, en una forma de realización, que los TDN de DS inducen una actividad citolítica potente contra una mayoría de hemoblastos de LMA primaria *in vitro*. Porcentaje de destrucción específica de 21 muestras de LMA primaria en las que TDN alogénicos actúan como mediadores en una relación efector a objetivo de 4:1. La Figura 3b muestra que el tratamiento de LMA con TDN antes de la inyección reduce significativamente el nivel de incorporación del injerto de LMA *in vivo*. El hemoblasto de LMA primaria #0578 se cultivó con o sin TDN durante 18 horas y se inyectó intrafemoralmente en ratones NSG (n=5 y n=3, respectivamente) irradiados subletalmente (225cGy). 31 días después del trasplante de hemoblastos, se sacrificaron ratones y se extrajeron células de médula ósea inyectadas, se tizaron con anti-CD33 y anti-CD45 humano y se analizaron mediante la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). El nivel de incorporación del injerto de LMA se determinó por la frecuencia de las células CD33+ y CD45+

humano. Se muestra el % medio de incorporación de un injerto para cada grupo y la barra de errores representa el EEM. * muestra una diferencia significativa en comparación con el control de solo hemoblastos (* $p < 0,05$)

La Figura 4 muestra que los TDN alogénicos actúan como mediadores en la actividad antileucémica y que los TDN alogénicos pueden dirigirse a hemoblastos de LMA primaria *in vivo*. A los ratones NSG irradiados subletalmente se les incorporó un injerto de LMA primaria mediante inyección intrafemoral de $5,0 \times 10^6$ hemoblastos de pacientes n°5786 (Figura 4a) o n°090392 (Figura 4b). 10 o 14 días después de la inyección n°5786 o n°090392, respectivamente, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa 2×10^7 TDN de voluntarios sanos o solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). El día 14-21 después de la inyección de TDN, se sacrificaron los ratones y las células de los huesos inyectados con hemoblastos se tizaron con anticuerpos marcados de forma fluorescente CD33, CD34, CD45 y CD38 antihumano. La frecuencia de las células de LMA en los huesos inyectados con hemoblastos se determinó por el porcentaje de células positivas CD33, CD33, CD45 y/o CD38 humano.

La Figura 5 muestra que la terapia de dosis múltiples mejora la eficacia de la terapia con linfocitos T DN. Los ratones NSG a los que se les incorporó un injerto de $2,4 \times 10^6$ hemoblastos (n°090240) fueron tratados con TDN o permanecieron sin tratar 10 días después de la inyección de hemoblastos, como se ha descrito anteriormente. 37 días después de la inyección de hemoblastos, se sacrificaron los ratones y se les extrajo el bazo. Los hemoblastos de LMA encontrados en el bazo de ratones tratados con linfocitos T DN (▲) o no tratados (■) y el hemoblasto de LMA del paciente primario, 090240 (●), se utilizaron como objetivos para el ensayo de destrucción basado en flujo llevado a cabo con TDN expandidos de 2 donantes sanos, y se determinó el % de destrucción específica para cada objetivo, tal como se describe en el Ejemplo 3. Para determinar si los hemoblastos de LMA residuales después del tratamiento con TDN eran resistentes a la citotoxicidad en la que linfocitos T DN actuaban como mediadores, los hemoblastos residuales se aislaron de bazos de ratones tratados con linfocitos T DN y PBS. La sensibilidad de las células de LMA residuales extraídas y el hemoblasto de LMA primaria utilizado inicialmente para la incorporación de un injerto a una citólisis *in vitro* en la que linfocitos T DN actuaban como mediadores se determinó usando un ensayo de destrucción basado en flujo (Figura 5a). En base a esta observación, se probó la eficacia del tratamiento multidosis de linfocitos T DN. Las Figuras 5b y 5c muestran que los TDN pueden actuar como mediadores en la actividad antileucémica *in vivo* dependiendo de la dosis. A ratones NSG se les incorporó un injerto de $2,4 \times 10^6$ hemoblastos n°090240, tal como se ha descrito anteriormente, y fueron tratados con 2×10^7 TDN el día 20 (1x TDN) o el día 10 y el día 20 (2x TDN) después de la inyección de hemoblastos, o permanecieron sin tratamiento. El día 34 después de la inyección de hemoblastos se sacrificaron los ratones y se determinó, como se ha descrito anteriormente, la frecuencia de las células de LMA a las que se ha incorporado un injerto en la médula ósea (Figura 5b) y el bazo (Figura 5c) inyectadas con hemoblastos. Se muestra el % medio de la incorporación del injerto de LMA y la barra de errores representa el EEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

La Figura 6 muestra que los TDN pueden dirigirse tanto a la LMA sensible a la quimioterapia antineoplásica como a la resistente a la quimioterapia antineoplásica. El ensayo de destrucción basado en flujo se llevó a cabo contra muestras de LMA primaria obtenidas de pacientes resistentes a la quimioterapia antineoplásica, refractarios (vacíos) o recidivantes (llenos) (Figura 6a) o pacientes sensibles a la quimioterapia antineoplásica (Figura 6b). Las células se cocubaron en una relación efector a objetivo de 4:1 durante 2 horas. La Figura 6c muestra una comparación del porcentaje de destrucción específica en una relación efector a objetivo de 4:1 calculada a partir de las muestras resistentes a la quimioterapia antineoplásica (n=10) y sensibles a la quimioterapia antineoplásica (n=8). Los números representan el valor del % medio de destrucción específica con el EEM. n.s. - no significativo estadísticamente.

La Figura 7 muestra el direccionamiento potencial de las LSC en las que los TDN actúan como mediadores *in vivo*. Los ratones NSG a los que se les ha incorporado un injerto de hemoblastos altamente agresivos, 090240, fueron tratados con 2×10^7 TDN o PBS 10 días después de la inyección de hemoblastos. En los 39 días posteriores a la inyección de hemoblastos se sacrificaron los ratones y se determinó la frecuencia o la frecuencia y el número de células de LMA en tejidos no inyectados, huesos no inyectados (Figura 7a) y bazo (Figuras 7b y 7c), respectivamente. Cada línea representa el promedio y la barra de errores representa el EEM. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

La Figura 8 muestra la actividad antileucémica de la terapia combinada con TDN y quimioterapia antineoplásica. Los ratones NSG a los que se les ha incorporado un injerto de hemoblasto, 090240, fueron tratados con PBS (sin tratamiento, ●), o ara-C (ara-C, ■), o ara-C seguido de TDN (ara-C + TDN, ◆). En los 37 días posteriores a la inyección de hemoblastos se sacrificaron los ratones y se determinó la frecuencia de las células de LMA en los huesos inyectados (Figura 8a), en los huesos no inyectados (Figura 8b) y en el bazo (Figura 8c). Cada línea representa el promedio y la barra de errores representa el EEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

La Figura 9a muestra el efecto de un fármaco de quimioterapia antineoplásica, ara-C, en la sensibilidad de las células de LMA a la actividad citotóxica de los TDN. KG1a se trató con 1 ug/ml de ara-C o PBS durante 14 horas. Posteriormente, KG1a fue cocultivada con TDN expandidos *ex vivo* de donantes sanos en una relación efector a objetivo de 4:1 durante 4 horas. El nivel de destrucción específica inducida para cada objetivo se determinó como se ha descrito anteriormente. La Figura 9b muestra que ara-C no interfiere en la función citotóxica de los TDN. Los TDN

expandidos *ex vivo* fueron pretratados con ara-C o PBS durante 14 horas y se utilizaron para el ensayo de destrucción *in vitro* contra la línea celular de LMA, OCI-LMA3, en una relación efector a objetivo de 4:1 durante 4 horas. El nivel de destrucción específica inducida por cada TDN se determinó como se ha descrito anteriormente.

5 La Figura 10 muestra la caracterización fenotípica de las CMSP y los TDN después de la expansión. Las CMSP (paneles superiores) o los TDN extraídos 14 días después de la expansión (paneles inferiores) se tizaron con anticuerpos contra CD4, CD8, α GalCer-CD1d y CD3 humano. Los histogramas llenos representan el control de fluorescencia menos uno (FMO, por sus siglas en inglés). Los números en los gráficos representan la frecuencia de la población en cada cuadrante o entrada. ($***p < 0,001$)

10 Las Figuras 11a y 11b muestran que los TDN de donantes sanos (DS) no atacan a las células madre hematopoyéticas *in vivo* e influyen en su diferenciación. Se inyectaron CD133⁺CD34⁺ CMH humana por vía intravenosa en ratones NSG irradiados subletalmente (5×10^6 células/ratón, n =13). Ocho semanas después de la inyección de CMH, a 7 ratones se les inyectó por vía intravenosa 10^7 TDN alogénicos expandidos *ex vivo*. Ocho semanas después de la inyección de TDN, se extrajeron células de SP y se tizaron con anticuerpos CD45 antimurino, CD3, CD19, CD11b, CD56, CD33, CD34 y CD45 antihumano. El porcentaje de leucocitos humanos (Figura 11a) y sus subconjuntos (Figura 11b) se determinaron mediante análisis de citometría de flujo. Las barras horizontales representan el valor medio y las barras de errores representan el EEM de cada grupo.

15 La Figura 12 muestra que los linfocitos T DN pueden recuperar ratones NSG a los que se ha inyectado dosis letales de línea celular de LMA. A ratones NSG irradiados subletalmente se les inyectó 10^6 MV4-11 por vía intravenosa, y a partir del día 7 recibieron tres inyecciones de 2×10^7 TDN (n=9) o PBS (n=10) con cuatro días de separación entre inyecciones. Las flechas representan el momento de las inyecciones de TDN o PBS. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

Descripción detallada

25 [0032] En un aspecto, los inventores han determinado que los TDN son útiles para el tratamiento del cáncer y, en particular, para el tratamiento de leucemia o linfoma. En una forma de realización, también se ha determinado que los TDN se pueden utilizar para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas o para destruir células cancerosas, incluidas las células cancerosas que son resistentes a la quimioterapia antineoplásica. En una forma de realización preferida, los TDN descritos en la presente memoria se pueden utilizar para el tratamiento de LMA, o el tratamiento de LMA recurrente o recidivante, tal como la LMA causada por una enfermedad mínima residual. En otra forma de realización, los TDN descritos en la presente memoria se pueden utilizar para el tratamiento de linfoma.

30 [0033] Como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" se refiere a una de un grupo de enfermedades causadas por el crecimiento incontrolado y anormal de células que se pueden diseminar a tejidos adyacentes u otras partes del cuerpo. Las células cancerosas pueden formar un tumor sólido, en el que las células cancerosas se agrupan, o existen como células dispersas, como en la leucemia.

35 [0034] El término "célula cancerosa" se refiere a una célula caracterizada por un crecimiento incontrolado y anormal y la capacidad de invadir otro tejido o una célula derivada de esta célula. Las células cancerosas incluyen, por ejemplo, una célula cancerosa primaria obtenida de un paciente con cáncer o una línea celular derivada de esta célula. En una forma de realización, la célula cancerosa es una célula cancerosa hematológica tal como una célula leucémica o una célula de linfoma. Por ejemplo, en una forma de realización, la célula cancerosa puede ser una célula leucémica de un sujeto con LMA o una célula de linfoma tal como una célula de un sujeto con linfoma no hodgkiniano (LNH). En una forma de realización, la célula cancerosa puede ser una célula cancerosa leucémica en un sujeto con LMA. En una forma de realización, los TDN descritos en la presente memoria se pueden utilizar para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En una forma de realización, los TDN descritos en la presente memoria se pueden utilizar para destruir células cancerosas *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

45 [0035] Como se usa en la presente memoria, "cáncer resistente a la quimioterapia antineoplásica" se refiere a cánceres que no responden al tratamiento con quimioterapia antineoplásica o que recidivan después del tratamiento con quimioterapia antineoplásica. Por ejemplo, células resistentes a la quimioterapia antineoplásica pueden ser células cancerosas primarias obtenidas de sujetos que no responden a la quimioterapia antineoplásica o células cancerosas obtenidas de sujetos que inicialmente han respondido a la quimioterapia antineoplásica y en remisión, sin embargo, experimentan una recaída de la enfermedad. En algunos sujetos, después de la recaída, las células cancerosas ya no responden a la quimioterapia antineoplásica y dichos sujetos tienen cáncer resistente a la quimioterapia antineoplásica. En una forma de realización, células resistentes a la quimioterapia antineoplásica son células leucémicas primarias obtenidas directamente de sujetos.

50 [0036] El término "leucemia", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier enfermedad que implique la proliferación progresiva de leucocitos anómalos que se encuentran en mayor número en los tejidos

hematopoyéticos, en otros órganos y generalmente en la sangre. Se denomina "células leucémicas" a leucocitos caracterizados por un aumento de la proliferación anómala de dichas células.

5 [0037] Como se usa en la presente memoria, se denomina "leucemia mielógena aguda" ("LMA") a un cáncer de la línea mielógena de células sanguíneas caracterizado por el rápido crecimiento de glóbulos blancos anómalos que se acumulan en la médula ósea e interfieren en la producción de células sanguíneas normales.

[0038] Como se usa en la presente memoria, se denomina "leucemia mielógena crónica" ("LMC") a un cáncer caracterizado por el aumento de crecimiento no regulado de células mielógenas predominantemente en la médula ósea y la acumulación de estas células en la sangre.

10 [0039] Como se usa en la presente memoria, se denomina "linfoma" a una enfermedad caracterizada por tumores de células sanguíneas que se desarrollan a partir de células linfáticas. Opcionalmente, el linfoma puede ser un linfoma de Hodgkin (LH) o un linfoma no hodgkiniano (LNH). Ejemplos de LNH incluyen el linfoma de Burkitt y el linfoma linfocítico T. Se denomina "células de linfoma" a linfocitos caracterizados por un aumento de la proliferación anómala de estas células.

15 [0040] El término "sujeto", tal como se usa en la presente memoria, incluye a todos los miembros del reino animal, incluidos los mamíferos, y se refiere de forma apropiada a los seres humanos. Opcionalmente, el término "sujeto" incluye mamíferos a los que han diagnosticado cáncer o están en remisión. En una forma de realización, el término "sujeto" se refiere a un ser humano que tiene, o se sospecha que tiene, un cáncer hematológico. En una forma de realización, el término "sujeto" se refiere a un ser humano que tiene LMA o se sospecha que tiene LMA, opcionalmente LMA recurrente o recidivante.

20 [0041] En una forma de realización, los métodos *in vitro* y usos médicos descritos en la presente memoria proporcionan el tratamiento de cáncer. El término "tratar" o "tratamiento" como se usa en la presente memoria y también como se entiende en la técnica es una práctica para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, de modo no taxativo, alivio o mejora de uno o más síntomas o trastornos, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento) (por ejemplo, manteniendo un paciente en remisión),
25 prevención de la enfermedad o prevención de la diseminación de la enfermedad, retraso o ralentización de la evolución de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, disminución de la reaparición de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratar" y "tratamiento" también pueden significar prolongar la supervivencia en comparación con la expectativa de supervivencia en caso de no recibir tratamiento. "Tratar" y "tratamiento", como se usan en la presente memoria, también incluyen tratamiento profiláctico. En una forma de realización, los usos médicos relacionados con el tratamiento comprenden administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de TDN como se describe en la presente memoria y opcionalmente consiste en una única administración, o de forma alternativa comprende una serie de administraciones. En algunas formas de realización, los usos médicos relacionados con el tratamiento y los usos *in vitro* descritos en la presente memoria incluyen terapia combinada con TDN y un inhibidor del ciclo celular.
35

[0042] Como se usa en la presente memoria, se denomina "reducir el crecimiento o la proliferación de una célula cancerosa" a una reducción en el número de células que surgen de una célula cancerosa como resultado del crecimiento celular o la división celular e incluye la muerte celular. El término "muerte celular", como se usa en la presente memoria, incluye todas las formas de destrucción de una célula, incluyendo necrosis y apoptosis.

40 [0043] En un caso, el uso médico y los usos *in vitro* descritos en la presente memoria implican la administración o el uso de una cantidad eficaz de TDN y, opcionalmente, un inhibidor del ciclo celular. Como se usa en la presente memoria, la frase "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. Por ejemplo, en el contexto o tratamiento de un cáncer tal como LMA, una cantidad eficaz es una cantidad que, por ejemplo, induce a
45 la remisión, reduce la carga tumoral y/o previene la diseminación tumoral o el crecimiento de células leucémicas en comparación con la respuesta obtenida sin la administración del compuesto. Las cantidades eficaces pueden variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del animal. La cantidad de un compuesto dado que corresponderá a esta cantidad variará dependiendo de diversos factores, tales como el fármaco o compuesto dado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno,
50 la identidad del sujeto o huésped que se está tratando y similares, aunque también puede ser determinada de forma rutinaria por un experto en la técnica.

[0044] En un caso, los usos médicos y las composiciones descritas en la presente memoria implican la administración o el uso de linfocitos T doble negativos (DN). Los TDN exhiben una serie de características que los distinguen de otros tipos de linfocitos T. En una forma de realización, los TDN no expresan CD4 ni CD8. En una
55 forma de realización, los TDN expresan el complejo RLT de CD3 y no expresan CD4 ni CD8. En una forma de realización, los TDN tienen el fenotipo CD3+, RLT+ αβ, CD4-, CD8-, CD44-, CD28-. En una forma de realización, los

TDN tienen el fenotipo CD3+, RLT+ $\alpha\beta$, CD4-, CD8-, α -Gal-, PD-1-, CTLA4-, CD44+, CD28-. En una forma de realización, los TDN tienen el fenotipo CD3+, CD4-, CD8-, α -Gal-, PD-1-, CTLA4-, CD44+. En una forma de realización, los TDN tienen el fenotipo CD3+, CD4-, CD8-, α -Gal-, J α 24-, V α 14-, CD44+, PD-1-, CTLA4-, CD45R0+. Los TDN se pueden obtener utilizando tecnologías conocidas en la técnica tales como la clasificación de células activadas fluorescentes (FACS), aunque de modo no taxativo. En una forma de realización, los TDN se pueden aislar de células mononucleares de sangre periférica. Opcionalmente, los TDN pueden ser células autógenas o células alogénicas.

[0045] En una forma de realización, los TDN son células autógenas obtenidas de un sujeto con cáncer o sospechoso de tener cáncer. Opcionalmente, los TDN se obtienen del sujeto antes, durante o después de la quimioterapia antineoplásica. En una forma de realización, los TDN se obtienen de un sujeto antes, durante o después de un ciclo de quimioterapia antineoplásica. Por ejemplo, en una forma de realización, los TDN se obtienen después de un primer ciclo de quimioterapia antineoplásica, o después de uno o más ciclos de quimioterapia antineoplásica.

[0046] En algunas formas de realización, los TDN pueden expandirse *in vitro* o *ex vivo* antes de su uso o administración a un sujeto. Se describen métodos ilustrativos para aislar y expandir TDN en la patente US 6,953,576 "Method of Modulating Tumor Immunity" y la publicación PCT WO2007/056854 "Method of Expanding Double Negative T Cells".

[0047] En una forma de realización, los TDN se pueden obtener de un sujeto al que posteriormente se administrarán los TDN (es decir, células autógenas) con el fin de tratar el cáncer, reducir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas o destruir células cancerosas. En una forma de realización, los TDN pueden ser alogénicos. Como se usa en la presente memoria, el término "alogénico" se refiere a células que se obtienen originalmente de un sujeto que es un individuo diferente del receptor previsto de dichas células, pero que es de la misma especie que el receptor. Opcionalmente, las células alogénicas pueden ser células de un cultivo celular. En una forma de realización preferida, los TDN se obtienen de un donante sano. Como se usan en la presente memoria, los términos "voluntario sano" ("VS") o "donante sano" ("DS") se refieren a uno o más sujetos sin cáncer. En una forma de realización, el donante sano es un sujeto sin células cancerosas detectables, tal como un sujeto sin células leucémicas detectables.

[0048] En una forma de realización, los TDN se pueden formular para utilizarse o prepararse para su administración a un sujeto usando formulaciones farmacéuticamente aceptables conocidas en la técnica. Se describen procedimientos e ingredientes convencionales para la selección y preparación de formulaciones adecuadas, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (2003 - 20ª edición) y en The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicado en 1999. El término "farmacéuticamente aceptable" significa compatible con el tratamiento de animales, en particular, seres humanos.

[0049] En una forma de realización, los TDN descritos en la presente memoria son sorprendentemente eficaces para reducir la proliferación de células cancerosas y/o tratar el cáncer en combinación con un antineoplásico químico. En una forma de realización, el antineoplásico químico es un inhibidor del ciclo celular. En una forma de realización, el inhibidor del ciclo celular es un inhibidor de síntesis de ADN. En consecuencia, en una forma de realización se proporciona un uso médico para el tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto TDN y un antineoplásico químico. También se proporciona un uso de TDN y un antineoplásico químico para el tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita. En una forma de realización, el antineoplásico químico es citarabina (ara-C). En una forma de realización, el cáncer es una leucemia tal como la leucemia mielógena aguda (LMA). En algunas formas de realización, se pueden usar TDN en combinación con un antineoplásico químico tal como un inhibidor del ciclo celular para tratar cánceres que son resistentes a la quimioterapia antineoplásica, tal como LMA recurrente o recidivante.

[0050] Como se usa en la presente memoria, el término "inhibidor del ciclo celular" se refiere a un antineoplásico químico que inhibe o previene la división y/o replicación de células. En una forma de realización, el término «inhibidor del ciclo celular» incluye un antineoplásico químico seleccionado de doxorubicina, melfalán, roscovitina, mitomicina C, hidroxycarbamida, 5-fluorouracilo, cisplatino, ara-C, etopósido, gemcitabina, bortezomib, sunitinib, sorafenib, ácido valproico, inhibidores de HDAC o dacarbazina. Ejemplos de inhibidores de HDAC incluyen, aunque no de modo taxativo, FR01228, Trichostatina A, SAHA y PDX101.

[0051] Como se usa en la presente memoria, el término "inhibidor de síntesis de ADN" se refiere a un antineoplásico químico que inhibe o previene la síntesis de ADN mediante una célula cancerosa. Ejemplos de inhibidores de síntesis de ADN incluyen, de modo no taxativo, ara-C (citarabina), 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 5-fluorouracilo, capecitabina, floxuridina, gemcitabina, decitabina, vidaza, fludarabina, nelarabina, cladribina, clofarabina, pentostatina, tiarabina, troxacitabina, sapacitabina o forodesina. En una forma de realización, el inhibidor de síntesis de ADN es citarabina u otro análogo de desoxicitidina como se describe en la presente memoria. En una forma de realización, el inhibidor de síntesis de ADN es un terminador de alargamiento de ADN y funciona de manera similar a la citarabina, tal como fludarabina, nelarabina, cladribina o clofarabina.

[0052] Como se usa en la presente memoria, "ara-C" (arabinofuranosil citidina) se refiere a un compuesto que comprende una base de citosina y un azúcar de arabinosa que se convierte en trifosfato de arabinofuranosilcitosina *in vivo*. También se conoce Ara-C como citarabina o arabinósido de citosina.

5 [0053] En una forma de realización, los TDN y el antineoplásico químico se administran al sujeto al mismo tiempo, opcionalmente como una composición que comprende los TDN y el antineoplásico químico, o como dos dosis separadas. En una forma de realización, los TDN y el antineoplásico químico se usan o administran al sujeto en diferentes momentos. Por ejemplo, en una forma de realización, los TDN se administran antes o después del antineoplásico químico. En una forma de realización, los TDN se administran antes o después del antineoplásico químico separados por un tiempo de al menos 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1,5 horas, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas 16 horas o 24 horas. Opcionalmente, en algunas formas de realización, los TDN y el antineoplásico químico se administran al sujeto separados por más de 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, una semana, 10 días, 12 días, dos semanas, tres semanas, un mes, 6 semanas, 2 meses o más de 2 meses. En una forma de realización, los TDN se administran o usan entre 2 días y 7 días después del antineoplásico químico.

15 [0054] Además, se proporciona una composición que comprende TDN y un antineoplásico químico. En una forma de realización, el antineoplásico químico es un inhibidor de síntesis de ADN. En una forma de realización, el inhibidor de síntesis de ADN es citarabina u otro análogo de desoxicitidina como se ha descrito en la presente memoria. Opcionalmente, las composiciones descritas en la presente memoria incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como los descritos en Remington 's Pharmaceutical Sciences (2003 - 20ª edición) y en The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicado en 1999. También se proporciona el uso de una composición que comprende TDN y un antineoplásico químico para el tratamiento de cáncer. En una forma de realización, el cáncer es leucemia, opcionalmente LMA. En una forma de realización, la composición es para su uso en el tratamiento del cáncer que es resistente al tratamiento con quimioterapia antineoplásica sola. En una forma de realización, el sujeto tiene leucemia, opcionalmente LMA.

25 [0055] Los siguientes ejemplos no taxativos ilustran la presente divulgación:

Ejemplo 1: Expansión de TDN de sangre periférica de donantes sanos.

[0056] Se obtuvieron 20 ml de SP de DS o pacientes con LMA en remisión completa después de la quimioterapia antineoplásica. Los TDN se expandieron como se ha descrito anteriormente (Merims *et al.*, 2011). En resumen, las células CD4+ y CD8+ se agotaron a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante el uso de RosetteSep™. Las CMSP CD4- CD8- restantes se estimularon con un anticuerpo anti-CD3 unido a la placa durante 3 días, se lavaron, y le siguió una reestimulación con CD3 soluble desde el día 7 hasta el día 10. Los medios de cultivo se reemplazaron con medios frescos que contenían IL-2 los días 3, 7 y 10. Las células se contaron y se tizaron con anticuerpos anti-CD3, CD4, CD8, RLT de linfocitos T citolíticos naturales invariantes (iNKT, por sus siglas en inglés) (RLT de Vα24-Jα18) y un antígeno receptor NKT (α-galactosilceramida) al final de la expansión de 2 semanas. Se demostró un mayor potencial de expansión de los TDN de DS sobre los TDN del paciente en cultivos de expansión preparados con el mismo volumen de SP de pacientes con LMA en remisión completa y DS, ya que se obtuvo un número significativamente mayor de TDN cuando se expandieron de la SP de DS ($3,97 \pm 18,24 \times 10^8$) que de la del paciente ($3,25 \pm 0,9169 \times 10^7$) (Figura 1a). Además, los TDN no se expandieron en aproximadamente el 50% de los casos de LMA, y se obtuvo una mayor pureza de la población de TDN cuando se utilizó la SP de DS ($90,74\% \pm 1,7\%$) en comparación con $65,0\% \pm 19,8\%$ cuando se usó la SP del paciente con LMA (Tabla 1). El menor potencial de expansión y la pureza del TDN del paciente puede deberse en parte al agotamiento por encontrar células de LMA en la sangre del paciente y/o fisiología anómala causada por una quimioterapia antineoplásica rigurosa. La falta de expansión o de adquisición de TDN puros para el tratamiento puede imponer una limitación seria en el uso de TDN en el entorno clínico. Sin embargo, estos datos indican que dichas limitaciones se pueden evitar utilizando TDN de DS, proporcionando una justificación para centrarse en los TDN de DS alogénicos.

Tabla 1: Frecuencia del linfocito T DN del paciente y de VS al final de la expansión. Resumen de la pureza de linfocitos T DN al final de los cultivos de expansión configurados con sangre periférica del paciente o de VS.

	Paciente	VS
Cultivo#	28	24
% CD3	94,0±7,2	97,04±0,3
Estadísticas	P=0,044	
% TDN	65,0±19,8	90,74±1,7
Estadísticas	P < 0,001	

Ejemplo 2: Caracterización de TDN humanos en un modelo de ratón NSG.

[0057] La terapia de linfocitos T adoptivos satisfactoria se basa en la supervivencia y persistencia de linfocitos T inyectados en receptores para que estas células puedan encontrar y eliminar células tumorales. Idealmente, los linfocitos T infundidos son capaces de multiplicarse adicionalmente en los receptores de modo que se necesitarán cantidades relativamente pequeñas de linfocitos T para la inyección. Dado que los TDN se generan en un período relativamente corto (dentro de las 2 semanas posteriores a la recogida inicial de la muestra), estos TDN son probablemente efectores iniciales y pueden proliferar y persistir después de la inyección. Para probar esta hipótesis, se utilizó un modelo de ratón NSG inmunodeficiente. Los TDN expandidos *ex vivo* del día 10 se marcaron con 5 μM de CFSE y se inyectó 2×10^7 de células por vía intravenosa en ratones NSG irradiados subletalmente. Con el fin de mantener los TDN humanos, los ratones receptores se complementaron con una inyección intraperitoneal de hrIL-2 (10.000 unidades internacionales (u.i.)). Se extrajo sangre, el bazo, médula ósea, el hígado y el pulmón el día 2, día 4 y día 7 para determinar la proliferación, la migración y la persistencia de los TDN *in vivo*. Como se muestra en la Figura 1b, se observó la dilución de CFSE desde el día 2 hasta el día 4, pero no desde el día 4 hasta el día 7, lo que indica que después de la transferencia adoptiva, los TDN proliferaron en los primeros días después de la inyección. Las células extraídas se tintaron con anticuerpo CD45 antihumano y se analizaron usando FACS para determinar la frecuencia de los TDN en diferentes tejidos a lo largo del tiempo. Se detectó una frecuencia relativamente mayor de TDN en la sangre, el bazo y el pulmón después de la inyección, mientras que se observó una población de TDN más pequeña pero notable en el hígado y la médula ósea hasta 7 días después de la inyección (Figura 1c).

Ejemplo 3: Desarrollo de un ensayo de destrucción basado en flujo.

[0058] El ensayo de liberación de cromo ha sido el ensayo estándar más utilizado para determinar el nivel de citotoxicidad de las células objetivo. Sin embargo, debido a una baja eficacia de carga de isótopos de cromo y una alta tasa de muerte espontánea de hemoblastos de pacientes con LMA primaria, el ensayo de liberación de cromo ampliamente utilizado no fue óptimo para determinar la sensibilidad de los hemoblastos de LMA primaria a la citotoxicidad *in vitro* en la que los TDN actuaban como mediadores. Con el fin de determinar la capacidad de los TDN expandidos *ex vivo* para inducir actividad citotóxica contra la LMA *in vitro*, se desarrolló un nuevo ensayo de destrucción basado en citometría de flujo. En este ensayo, los TDN se marcaron con tinte de membrana fluorescente, PKH-26, y se cocultivaron con hemoblastos de LMA primaria durante 2 horas en diferentes relaciones efector a objetivo. Las células objetivo y efector se cultivaron solas como controles para determinar el nivel de muerte celular espontánea. 2 horas después de la coincubación, las células se tintaron con marcadores de superficie de anticuerpos CD33 y CD45 para identificar la LMA que es CD45^{bajo} y/o CD33⁺, y anexina V para identificar el nivel de muerte celular (Figura 2). El porcentaje de destrucción específica se determinó como:

$$\% \text{Destrucción específica} = \% \text{Anexina V}^+_{\text{cocultivo de TDN de LMA}} - \% \text{Anexina V}^+_{\text{LMA sola}}$$

[0059] En comparación con el ensayo de liberación de cromo convencional, el ensayo de destrucción basado en flujo es más rápido, está asociado a un menor ruido de fondo y no requiere preparación adicional de la célula objetivo, tal como carga de isótopos. Este nuevo ensayo permite monitorizar directamente el nivel de apoptosis celular de la LMA en la que los TDN actúan como mediadores dependiendo de la dosis, al tiempo que evita las limitaciones asociadas con el ensayo de liberación de cromo estándar. Además, se puede utilizar para determinar el efecto de los TDN en diferentes subpoblaciones de la población de LMA. Sin embargo, el ensayo de destrucción basado en flujo no puede determinar el nivel de la muerte celular acumulada.

Ejemplo 4: Los TDN expandidos a partir de DS se dirigen selectivamente a la LMA dependiendo de la dosis, pero no destruyen CMSP alogénicas normales *in vitro*.

[0060] Para determinar la citotoxicidad de TDN alogénicos hacia células leucémicas en relación con CMSP normales, el ensayo de destrucción basado en flujo se llevó a cabo con TDN alogénicos expandidos a partir de 3 donantes sanos diferentes contra CMSP normales obtenidas de dos DS, CMH obtenidas de dos DS, dos muestras de pacientes con LMA primaria y líneas celulares de LMA, OCI-LMA3 y KG1a. Los TDN de los tres donantes mostraron una potente actividad de destrucción contra los dos hemoblastos de LMA primaria y líneas celulares de LMA dependiendo de la dosis, pero no mostraron actividad de destrucción contra CMH y CMSP alogénicas (Figura 2b). Dado que los TDN pueden persistir en los receptores como se ve en el Ejemplo 2 y la Figura 1c, el cocultivo de CMSP sanas y TDN alogénicos se extendió a 14 horas. Nuevamente, los TDN no indujeron a la destrucción de CMSP alogénicas normales (datos no mostrados). Este hallazgo es consistente con los casos de ratones en los que la infusión de TDN alogénicos no causa lesiones patológicas en los receptores y, por lo tanto, son seguros. La capacidad de los TDN para dirigirse a células leucémicas alogénicas pero no a CMSP sanas sugiere que los TDN alogénicos son seguros para usar en el tratamiento de pacientes con leucemia.

Ejemplo 5: Los TDN son capaces de destruir hemoblastos de LMA primarios *in vitro* e inhibir la incorporación del injerto de leucemia en ratones NSG.

5 [0061] Para determinar la capacidad de los TDN expandidos a partir de DS para destruir células leucémicas, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad contra muestras de hemoblastos de LMA primaria obtenidas de un panel de 23 pacientes. Aunque hubo variación en el nivel de sensibilidad, en 19/23 casos los hemoblastos primarios del paciente fueron sensibles a la citotoxicidad *in vitro* en la que los TDN actuaban como mediadores dependiendo de la dosis, mientras que 4 hemoblastos del paciente mostraron un alto nivel de resistencia (Figura 3a). Estos datos demuestran que los TDN alogénicos pueden dirigirse de manera efectiva a la mayoría de los hemoblastos de LMA primaria.

10 [0062] Aunque la selección *in vitro* demostró un nivel significativo de citotoxicidad en la que los TDN actuaban como mediadores, seguía siendo incierto si esto se traduciría en una incorporación de un injerto de LMA menor o una reducción transitoria en la cantidad de LMA. A continuación, para investigar el efecto de TDN en la incorporación de un injerto de LMA *in vivo*, se determinó el nivel de incorporación de injerto de LMA tratado con o sin linfocitos T DN utilizando un modelo de xenoinjerto establecido de LMA-NSG (Barabe *et al.*, 2007). En resumen, el hemoblasto de LMA #0578 se cultivó con o sin TDN durante 18 horas, y le siguió una inyección en el fémur derecho de ratones NSG irradiados subletalmente. 31 días después del trasplante, se sacrificaron los ratones y se determinó la incorporación del injerto de LMA en el hueso inyectado. El nivel de incorporación del injerto de LMA se redujo significativamente en ratones inyectados con hemoblastos de LMA preincubados con TDN en comparación con los de control sin tratamiento, lo que demuestra que el efecto en el que los TDN actúan como mediadores puede reducir el nivel de células leucémicas *in vivo* (Figura 3b).

20 Ejemplo 6: Los TDN actúan como mediadores en la actividad antileucémica contra la LMA primaria dependiendo de la dosis *in vivo*.

[0063] La reducción en la incorporación del injerto de LMA observada en la Figura 3b es probablemente el resultado de la destrucción de células de LMA *in vitro* antes de su infusión. Para determinar además si los TDN infundidos pueden migrar al lugar de la incorporación del injerto de leucemia y eliminar la LMA preexistente en la médula ósea, lo que se asemeja más a las condiciones en un entorno clínico, se administró el tratamiento con TDN a ratones NSG a los que se incorporó injertos con hemoblastos de LMA, como se ha descrito anteriormente (Barabe *et al.*, 2007). En resumen, a los ratones se les inyectó $2,5 \times 10^6$ - $5,0 \times 10^6$ hemoblastos de LMA primaria, n°5786 o n°090392, en el fémur derecho. De diez a catorce días más tarde, momento en el cual las células leucémicas humanas se incorporaron en injertos a los receptores, los ratones a los que se había incorporado el injerto de LMA se les inyectó por vía intravenosa PBS o 2×10^7 TDN. Se sacrificaron los ratones después de 14-21 días después de la inyección de TDN, y las células de los huesos inyectadas con células de LMA se extrajeron y tintaron con anticuerpos marcados de forma fluorescente CD33, CD45, CD19, CD34, CD38 y CD3 antihumano para determinar el nivel de la incorporación del injerto de LMA mediante análisis FACS. La frecuencia de incorporación de injertos de células de LMA se comparó entre los grupos tratados con TDN y PBS. La frecuencia de hemoblastos de LMA n°5786 y n°090392 se redujo significativamente en el hueso inyectado del grupo tratado con TDN en comparación con el grupo tratado con PBS (Figuras 4a y 4b). Estos resultados demuestran que los TDN pueden migrar de la sangre a la médula ósea, donde se originan las células de LMA, y se dirigen a la LMA preexistente en las médulas óseas.

40 [0064] Si bien el tratamiento con TDN redujo significativamente la frecuencia de la incorporación del injerto de LMA, se observaron algunos hemoblastos residuales en el grupo tratado con TDN. Dos posibilidades pueden explicar las células de LMA residuales: 1) estas células son resistentes a la citotoxicidad en la que los TDN actúan como mediadores: 2) el tratamiento con una dosis de TDN puede no ser suficiente para eliminar un gran número de células de LMA preexistentes. Para determinar si las células de LMA restantes son sensibles a la citotoxicidad en la que los TDN actúan como mediadores, los hemoblastos de LMA residuales se aislaron del grupo tratado con TDN y el no tratado y se usaron como objetivos junto con el hemoblasto de LMA primaria utilizado inicialmente para la incorporación de un injerto en nuestros ensayos de destrucción basados en flujo. Los hemoblastos de LMA residuales obtenidos de ratones tratados con TDN eran igualmente sensibles a la destrucción *in vitro* en la que los TDN actuaban como mediadores como células de LMA primaria y células de LMA obtenidas del grupo tratado con PBS (Figura 5a), lo que indica que era poco probable que la persistencia de células de LMA se deba a su resistencia a la destrucción de TDN. Además, observamos que la capacidad de los TDN para reducir la incorporación del injerto de LMA se correlacionó inversamente con las frecuencias de las células de LMA preexistentes en los receptores (Figura 5b), lo que respalda la noción de que más de un tratamiento con TDN puede reducir aún más el nivel de incorporación del injerto de LMA. Para probar esta hipótesis, a unos ratones NSG se les inyectó intrafemorally hemoblasto n°090240 con alta incorporación de injerto. Diez días después de la inyección celular de LMA, a los ratones receptores se les infundió por vía intravenosa una dosis de TDN como anteriormente. Después de otros 10 días, se trató a la mitad de los ratones tratados con TDN con una segunda dosis de TDN del mismo donante. A los ratones de control se les inyectó PBS como controles. El grupo tratado con dos dosis de TDN mostró el nivel más bajo de incorporación del injerto de LMA en las médulas óseas y en el bazo (Figuras 5b y 5c). En el bazo, la segunda dosis de TDN redujo significativamente la frecuencia del hemoblasto en comparación con el grupo tratado con una sola dosis de TDN (Figura 5c). Aunque estadísticamente no es significativo, se observó la misma tendencia para las médulas óseas (Figura 5b), tal vez debido a una frecuencia muy alta de células de LMA preexistentes en la médula ósea. En conjunto, estos datos indican que los TDN son capaces de eliminar las células de LMA e inhibir la incorporación del injerto de leucemia en modelos de xenoinjerto. Por lo tanto, es probable que varias inyecciones

puedan mejorar la eficacia del tratamiento con TDN. Además, los TDN pueden ser particularmente eficaces como terapia adyuvante después de la eliminación de la mayoría de las células de LMA mediante quimioterapia antineoplásica convencional para dirigirse a una EMR. La administración o el uso inicial de quimioterapia antineoplásica tal como Ara-C puede ayudar a erradicar la mayoría de las células cancerosas, y seguido de una dosis de TDN puede ser más eficaz contra relativamente las pocas células que permanezcan y sean resistentes a la quimioterapia antineoplásica.

Ejemplo 7: La LMA resistente a la quimioterapia antineoplásica es sensible a los TDN.

[0065] La quimioterapia antineoplásica es el tratamiento estándar utilizado para pacientes con LMA. La quimioterapia antineoplásica es eficaz para reducir la carga leucémica y lograr la remisión inicial de la enfermedad. Sin embargo, a menudo no logra una remisión completa de la enfermedad, lo que conduce a una alta tasa de recaída en pacientes con LMA.

[0066] Por lo tanto, una de las principales limitaciones del tratamiento de pacientes con LMA es la incapacidad de dirigirse de manera efectiva a la LMA resistente a la quimioterapia antineoplásica, lo que da como resultado la alta tasa de LMA recidivante. Para estudiar si los TDN pueden dirigirse a la LMA resistente a la quimioterapia antineoplásica, las muestras de LMA obtenidas de pacientes resistentes y sensibles a la quimioterapia antineoplásica se utilizaron como objetivos para los TDN en nuestros ensayos de destrucción *in vitro*. Sorprendentemente, 7 de cada 10 muestras de pacientes con LMA resistente a la quimioterapia antineoplásica (Figura 6a) y 7 de cada 8 con LMA sensible a la quimioterapia antineoplásica, (Figura 6b) mostraron una sensibilidad significativa a los TDN. Además, el nivel de destrucción específica media era comparable en los grupos sensibles a la quimioterapia antineoplásica y los resistentes a la quimioterapia antineoplásica, $19,8 \pm 3,7\%$ y $16,6 \pm 4,1$ respectivamente (Figura 6c). La destrucción de la LMA resistente a la quimioterapia antineoplásica mediante TDN se validó adicionalmente con experimentos *in vivo* llevados a cabo con muestras obtenidas de pacientes resistentes a la quimioterapia antineoplásica, que no responden (nº5786, Figura 4a) y en recaída (nº090240, Figuras 5b y 5c), como se describe en el Ejemplo 6. El tratamiento con TDN redujo significativamente la carga de LMA en ambas muestras. Estos resultados demuestran que los TDN se pueden usar como inmunoterapia potencial para tratar a pacientes que no responden a la quimioterapia antineoplásica y resaltan el potencial para el uso clínico de los TDN contra la EMR resistente a la quimioterapia antineoplásica para lograr la remisión sin recaídas.

Ejemplo 8: Actividad potencial de direccionamiento de LSC en las que los TDN actúan como mediadores.

[0067] Anteriormente, la actividad citotóxica potencial de los TDN contra las LSC se presentó como una LMA diana de los TDN con expresión de CD34, un marcador expresado mediante las LSC (Merims *et al.*, 2011). Sin embargo, como no todas las células CD34+ representan la población de las LSC, el efecto de los TDN en las LSC siguió siendo incierto. En experimentos *in vivo* realizados con una muestra de LMA muy agresiva, nº090240 mostraron un alto nivel de incorporación del injerto de LMA en los tejidos no inyectados, en el bazo y en los huesos no inyectados. Debido a sus características iniciadoras y pobladoras del cáncer, se cree que las LSC actúan como mediadoras en la incorporación del injerto de LMA en tejidos no inyectados. Los resultados proporcionados en la presente memoria proporcionan evidencia de la destrucción potencial de las LSC en las que actúan los TDN como mediadores, ya que el tratamiento con TDN redujo el nivel de la incorporación del injerto de LMA en los huesos no inyectados (Figura 7a) y el bazo (Figuras 7b y 7c). Se desconoce si esta reducción está causada por la destrucción de la LMA que no son LSC en el lugar de la incorporación del injerto o la destrucción de las LSC inductoras de la incorporación del injerto.

Ejemplo 9: Eficacia de la terapia combinada con TDN y quimioterapia antineoplásica.

[0068] La quimioterapia antineoplásica es eficaz para reducir el tamaño de la leucemia en gran número y lograr la remisión inicial de la enfermedad. Sin embargo, no es muy eficaz para lograr la remisión completa de la enfermedad, y por lo tanto viene con la limitación de la LMA recidivante en la que la EMR actúa como mediadora. Por el contrario, la terapia con TDN es eficaz para dirigirse específicamente a la LMA, incluidos los cánceres que no se pueden destruir mediante quimioterapia antineoplásica, como se muestra en el Ejemplo 7. Sin embargo, el nivel de la carga de LMA parece ser un factor determinante importante para la eficacia de la terapia con TDN, al igual que en otras terapias celulares contra otros cánceres. Para determinar si se puede usar TDN y quimioterapia antineoplásica en combinación para superar las limitaciones asociadas a la terapia individual, a unos ratones NSG en los que se incorporó el injerto de LMA nº090240 se les inyectó intraperitonealmente un quimiofármaco estándar, arabinofuranosil citidina (ara-C), 60 mg/kg durante cinco días, comenzando 13 días después de la inyección de hemoblastos. 3 días después de la última inyección de ara-C, a los ratones se les inyectó TDN o PBS con suplemento de IL-2, como se ha descrito anteriormente. 14 días después de la inyección de TDN, se sacrificaron los ratones y se les extrajo médulas óseas y el bazo. Hubo una reducción significativa en la frecuencia de LMA con la terapia combinada en el hueso inyectado (Figura 8a), el hueso no inyectado (Figura 8b) y el bazo (Figura 8c). Aunque estadísticamente no es significativo, la terapia combinada también dio como resultado una frecuencia media en la incorporación del injerto de LMA más baja que en cualquiera de los tratamientos en solitario en los tres tejidos. En el bazo, el grupo que recibió la terapia combinada tuvo un nivel de incorporación del injerto de LMA

significativamente menor que el grupo que recibió solo la terapia de ara-C (Figura 8c). Estos datos demuestran colectivamente el efecto antileucémico añadido en el que actúan como mediadores los TDN y la quimioterapia antineoplásica, y el potencial de utilizar la terapia con TDN después de la quimioterapia antineoplásica para dirigirse a hemoblastos residuales después de la quimioterapia antineoplásica en la clínica. Por lo tanto, es probable que la terapia combinada con TDN y antineoplásicos químicos tal como ara-C sea más eficaz en el tratamiento de LMA que cualquier inmunoterapia con TDN o quimioterapia antineoplásica en solitario. Anteriormente no se sabía si la quimioterapia antineoplásica seguida de TDN daría como resultado alguna ventaja en la reducción de las células cancerosas. Como se indicó anteriormente, ara-C y TDN parecen dirigirse a diferentes células de LMA y, por lo tanto, una terapia combinada puede dar como resultado una ventaja significativa en comparación con cualquier tratamiento en solitario.

[0069] Para determinar si la actividad antileucémica superior del tratamiento combinado de ara-C y TDN se debe al efecto sinérgico de los dos o simplemente a un efecto añadido de dos tratamientos diferentes, se llevó a cabo un ensayo de destrucción *in vitro* contra la línea celular de la LMA similar a células madre leucémicas, KG1a. Se coincubó KG1a tratada con ara-C o PBS durante 14 horas con TDN. Ara-C hizo que la KG1a fuera significativamente más sensible a los TDN, ya que el porcentaje de destrucción inducido por los TDN era de $15,38 \pm 0,51\%$ frente a la KG1a no tratada y $45,59 \pm 2,34\%$ para la KG1a tratada con ara-C (Figura 9a). Sin embargo, el tratamiento de los linfocitos T DN con ara-C durante 14 horas antes del ensayo de destrucción *in vitro* contra OCI-LMA3 no tuvo ningún efecto en la citotoxicidad en la que actuaban los TDN como mediadores, lo que sugiere que los TDN se pueden usar simultáneamente con fármacos de quimioterapia (Figura 9b).

Ejemplo 10: Actividad citotóxica selectiva de linfocitos T doble negativos alogénicos contra la leucemia mielógena aguda

[0070] Como se indica a continuación, los inventores han determinado que los TDN humanos alogénicos tienen un potente efecto antileucémico contra los hemoblastos de pacientes con LMA primaria, incluidos los resistentes *in vitro* a la quimioterapia antineoplásica y en modelos de xenoinjerto sin toxicidad detectable para células y tejidos normales. Estos hallazgos apoyan el uso de TDN expandidos a partir de DS como una nueva terapia celular para pacientes con LMA para superar las limitaciones de los tratamientos actuales y aumentar la supervivencia del paciente.

TDN alogénicos expandidos ex vivo inducen una potente actividad citolítica contra los hemoblastos in vitro e in vivo de pacientes con LMA primaria.

[0071] Anteriormente, se demostró *in vitro* la citotoxicidad de los TDN expandidos *ex vivo* de la sangre periférica (SP) de pacientes con LMA en remisión completa contra hemoblastos leucémicos autógenos CD34⁺ (Merims *et al.*, 2011), pero solo se pudo expandir el 30% de los TDN de los pacientes (12 de 36 cultivos expandidos a 3×10^7 TDN o más).

[0072] En este caso, los inventores han demostrado sorprendentemente que los TDN se pueden expandir a partir de todos los DS evaluados con un promedio de 10 veces mayor el número total de TDN que el de los pacientes con LMA (Figura 1a) y una pureza significativamente mayor ($90,74\% \pm 1,7\%$ en los TDN de DS frente al $65,0\% \pm 19,8\%$ en los TDN de pacientes) (Figura 10).

La infusión de TDN no ataca a CMSP alogénicas normales ni a CMH CD34⁺.

[0073] Para determinar adicionalmente el efecto potencial de los TDN alogénicos en una incorporación de un injerto y una diferenciación normales de CMH, los ratones NSG se humanizaron mediante la incorporación del injerto de CMH de DS CD34⁺ y CD133⁺ y se trataron con TDN de diferentes DS. Como informaron otros (McDermott *et al.*, 2010, Drake *et al.*, 2011), se observó quimerismo consistentemente alto (~70-80%) dentro de los bazo y las MO de ratones a los que se había incorporado un injerto, mientras que el quimerismo en la sangre periférica era ~15%. Es importante destacar que no se observó ninguna diferencia en la frecuencia (Figura 11a) y la diferenciación de linajes (Figura 11b) entre ratones tratados con TDN y no tratados. Estos hallazgos sugieren que los TDN no se dirigen a CMH ni interfieren en la diferenciación de CMH en linajes hematopoyéticos. Juntos, estos resultados respaldan la seguridad de los TDN como una nueva inmunoterapia contra el cáncer al demostrar que los TDN alogénicos expandidos *ex vivo* tienen potentes actividades antileucémicas, pero no son citotóxicos para los tejidos normales y las células hematopoyéticas.

Los TDN alogénicos prolongan la supervivencia de ratones NSG con LMA letal.

[0074] A diferencia de la mayoría de hemoblastos de LMA primaria, la línea celular de LMA, MV4-11, es letal para los ratones NSG. Cuando se administraron tres inyecciones de TDN a ratones NSG inyectados con MV4-11, se observó un beneficio de supervivencia significativo en el grupo tratado con TDN (Figura 12). En su conjunto, estos

resultados demuestran que los TDN alogénicos expandidos *ex vivo* son citotóxicos para los hemoblastos *in vitro* de LMA primaria resistentes a la quimioterapia antineoplásica y eficaces para reducir las cargas de leucemia en los modelos de xenoinjerto.

Análisis de los resultados

5 [0075] A pesar del uso extensivo de quimioterapia antineoplásica para tratar a pacientes con LMA durante la última década, la alta tasa de recaída debido a la resistencia a la quimioterapia antineoplásica sigue siendo un desafío importante para la supervivencia del paciente (Lin & Levy, 2012, Hourigan & Karp, 2013). El TCMH alogénico es un posible tratamiento curativo para pacientes con LMA, pero su aplicación está limitada por la toxicidad que conlleva y la disponibilidad de donantes (Brissot & Mohty, 2015, Vyas *et al.*, 2015, MacDonald *et al.*, 2013). Como es evidente en la terapia de TCMH, linfocitos T y células NK, los efectos injerto contra leucemia en entornos alogénicos son más fuertes que aquellos en entornos autógenos debido a que las células inmunitarias de donantes reconocen aloantígenos que provocan reacciones inmunitarias robustas hacia las células transformadas (Arpinati & Curti, 2014, Campbell & Hasegawa, 2013, Ruggeri *et al.*, 2002, junio, 2007). Los TDN alogénicos de individuos sanos pueden dirigirse eficazmente a una gran matriz de hemoblastos de LMA primaria *in vitro* (Figuras 2b, 3a, 6a y 6b) e *in vivo* (Figuras 4 y 6c). Además, los hemoblastos residuales tras el tratamiento con TDN mostraron un alto nivel de sensibilidad a la destrucción de TDN comparable al asociado con el grupo no tratado y el hemoblasto primario utilizado inicialmente para la incorporación del injerto (Figura 5a) Esto sugiere que, a diferencia de la quimioterapia antineoplásica, los hemoblastos de LMA no desarrollan resistencia a los TDN después del tratamiento. Según esto, varios tratamientos de TDN reducen aún más la carga leucémica (Figura 5b y 5c). Más importante aún, los TDN se dirigieron de manera eficaz a las células de LMA resistentes a la quimioterapia antineoplásica (Figuras 5b, 5c y 6). Estos datos sugieren que los TDN se dirigen a las células de LMA a través de mecanismos que difieren de la quimioterapia antineoplásica y que los TDN se pueden usar solo para la LMA que no responde a la quimioterapia antineoplásica o en combinación con quimioterapia antineoplásica para dirigirse a la LMA resistente a la quimioterapia antineoplásica que inicia la recaída para superar así la limitación actual en el tratamiento de pacientes con LMA.

[0076] De acuerdo con la falta de respuesta alogénica (Figuras 2b y 12), los TDN de un solo donante pudieron destruir una matriz de células de LMA primaria y los hemoblastos de LMA de un solo paciente fueron lisados en un grado similar por TDN de diferentes donantes (datos no mostrados). Estas características apuntan a una aplicabilidad más amplia de los TDN como terapia celular y evitan la necesidad de producir células terapéuticas de cada paciente. Además, con un éxito reciente en el tratamiento del linfoma (Maude *et al.*, 2014), los estudios que utilizan tecnología CAR para dirigirse a la LMA se han vuelto más activos (Kenderian *et al.*, 2015, Lichtenegger *et al.*, 2015, Tettamanti *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2015). Dada su facilidad de expansión y expresión constitutivamente alta de moléculas efectoras con respuestas inmunitarias contra el cáncer (Merims *et al.*, 2011), los TDN pueden servir como un buen vector celular para la tecnología CAR y mejorar aún más su actividad antitumoral. Además, como los hemoblastos primarios obtenidos de pacientes resistentes a la quimioterapia antineoplásica y recidivantes son sensibles a la citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* en la que los TDN actúan como mediadores (Figura 6 y 7), los TDN se pueden usar como la primera línea para tratar a pacientes refractarios a la quimioterapia antineoplásica o como una terapia de consolidación después de la quimioterapia antineoplásica convencional para dirigirse a enfermedades mínimas residuales resistentes a la quimioterapia antineoplásica.

40 [0077] Si bien la presente divulgación se ha descrito con referencia a lo que actualmente se consideran los ejemplos preferidos, debe entenderse que la divulgación no se limita a los ejemplos divulgados.

Referencias bibliográficas:

[0078]

45 Menzin J, Lang K, Earle CC, Kerney D, Mallick R. The outcomes and costs of acute myeloid leukemia among the elderly. *Arch Intern Med.* 2002;162:1597-1603.

Ungewickell A, Medeiros BC. Novel agents in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2012;96:178-185.

Hoang VT, Zepeda-Moreno A, Ho AD. Identification of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia and their clinical relevance. *Biotechnol J.* 2012;7:779-788.

50 Bucisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, Arcese W, Amadori S, Venditti A. Prognostic and therapeutic implication of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012; 119:332-341.

Ferrara F, Palmieri S, Mele G: Prognostic factors and therapeutic options for relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Haematologica* 89 (8): 998-1008, 2004.

- Garces-Eisele J. Molecular biology strategies to detect residual disease. *Hematology*. 2012;17 Suppl 1:S66-8.
- Lin TL, Levy MY. Acute myeloid leukemia: focus on novel therapeutic strategies. *Clin Med Insights Oncol*. 2012;6:205-217.
- 5 Ishizawa K, Rasheed ZA, Karisch R et al. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell*. 2010;7:279-282.
- Kadowaki N, Kitawaki T. Recent advance in antigen-specific immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:104926.
- Vaz AP, Ponnusamy MP, Batra SK. Cancer stem cells and therapeutic targets: an emerging field for cancer treatment. *Drug Deliv Transl Res*. 2013; 3(2): 113-120.
- 10 Alatrash G, Molldrem JJ. Immunotherapy of AML. *Cancer treatment and research*. 2009: 145:237-55
- Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:340-352.
- Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*. 1988;319:1676-1680.
- 15 Teague RM, Kline J. Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions. *J Immunother Cancer*. 2013;1(13)
- Kochenderfer JN, Yu Z, Frasheri D, Restifo NP, Rosenberg SA. Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. *Blood*. 2010;116:3875-3886.
- 20 Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*. 2009;114:535-546.
- Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther*. 2011;19:620-626.
- Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol*. 2011;29:917-924.
- 25 Peinert S, Prince HM, Guru PM et al. Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen. *Gene Ther*. 2010;17:678-686.
- Xue SA, Gao L, Thomas S et al. Development of a Wilms' tumor antigen-specific T-cell receptor for clinical trials: engineered patient's T cells can eliminate autologous leukemia blasts in NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2010;95:126-134.
- 30 Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, Riviere I, Sadelain M. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther*. 2010;18:666-668.
- Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med*. 2000;6:782-789.
- 35 Young KJ, Kay LS, Phillips MJ, Zhang L. Antitumor activity mediated by double-negative T cells. *Cancer Res*. 2003;63:8014-8021.
- Merims S, Li X, Joe B et al. Anti-leukemia effect of ex vivo expanded DNT cells from AML patients: a potential novel autologous T-cell adoptive immunotherapy. *Leukemia*. 2011;25:1415-1422.
- 40 Young KJ, DuTemple B, Phillips MJ, Zhang L. Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J Immunol*. 2003;171:134-141. He KM, Ma Y, Wang S et al. Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. *Eur J Immunol*. 2007;37:3455-3466.
- Mclver Z, Serio B, Dunbar A et al. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2008;141:170-178.

- Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med.* 2001;7:789-794.
- 5 Barabe F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science.* 2007;316:600-604.
- Ali N, Flutter B, Sanchez Rodriguez R, Sharif-Paghaleh E, Barber LD, Lombardi G, Nestle FO. Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2Ry null mice display a T-effector memory phenotype. *PLoS One.* 2012;7(8):e44219
- 10 Merims, S., P. Dokouhaki, B. Joe, and L. Zhang. 2011. Human Vd1-T cells regulate immune responses by targeting autologous immature dendritic cells. *Hum. Immunol.* 72: 32-36.
- Kenderian, S. S. et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia*, doi:10.1038/leu.2015.52 (2015).
- Lichtenegger, F. S., Krupka, C., Kohnke, T. & Subklewe, M. Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *Semin Hematol* 52, 207-214, doi:10.1053/j.seminhematol.2015.03.006 (2015).
- 15 Tettamanti, S., Biondi, A., Biagi, E. & Bonnet, D. CD123 AML targeting by chimeric antigen receptors: A novel magic bullet for AML therapeutics? *Oncoimmunology* 3, e28835, doi:10.4161/onci.28835 (2014).
- Wang, Q. S. et al. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol Ther* 23, 184-191, doi:10.1038/mt.2014.164 (2015).
- 20 Arpinati, M. & Curti, A. Immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Immunotherapy* 6, 95-106, doi:10.2217/imt.13.152 (2014).
- Campbell, K. S. & Hasegawa, J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *The Journal of allergy and clinical immunology* 132, 536-544, doi:10.1016/j.jaci.2013.07.006 (2013).
- Ruggeri, L. et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097-2100, doi:10.1126/science.1068440 (2002).
- 25 LZ June, C. H. (2007). "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic." *Journal of Clinical Investigation* 117(6): 1466-1476.
- Hourigan, C. S. & Karp, J. E. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol* 10, 460-471, doi:10.1038/nrclinonc.2013.100 (2013).
- 30 Brissot, E. & Mohty, M. Which Acute Myeloid Leukemia Patients Should Be Offered Transplantation? *Semin Hematol* 52, 223-231, doi:10.1053/j.seminhematol.2015.03.001 (2015).
- Vyas, P., Appelbaum, F. R. & Craddock, C. Reprint of: Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 21, S3-10, doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.032 (2015).
- MacDonald, K. P., Shlomchik, W. D. & Reddy, P. Biology of graft-versus-host responses: recent insights. *Biol Blood Marrow Transplant* 19, S10-14, doi:10.1016/j.bbmt.2012.11.005 (2013).
- 35 McDermott, S. P., Eppert, K., Lechman, E. R., Doedens, M. & Dick, J. E. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. *Blood* 116, 193-200, doi:10.1182/blood-2010-02-271841 (2010).
- Drake, A. C. et al. Human CD34+ CD133+ hematopoietic stem cells cultured with growth factors including Angptl5 efficiently engraft adult NOD-SCID Il2rgamma-/- (NSG) mice. *PLoS One* 6, e18382, doi:10.1371/journal.pone.0018382 (2011)
- 40 Covassin, L. et al. Human peripheral blood CD4 T cell-engrafted non-obese diabetic-scid IL2rgamma(null) H2-Ab1 (tm1Gru) Tg (human leucocyte antigen D-related 4) mice: a mouse model of human allogeneic graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* 166, 269-280, doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04462. (2011).

REIVINDICACIONES

1. Combinación de una cantidad eficaz de linfocitos T doble negativos (DN) (TDN) alogénicos maduros y un antineoplásico químico para su uso en el tratamiento de leucemia o linfoma en un sujeto que lo necesita, donde los TDN se han expandido *in vitro* o *ex vivo* y el antineoplásico químico es un inhibidor del ciclo celular.
- 5 2. Combinación de una cantidad eficaz de una primera dosis de linfocitos T doble negativos (DN) (TDN) alogénicos maduros y una o más dosis separadas adicionales de una cantidad eficaz de TDN alogénicos maduros para su uso en el tratamiento de leucemia o linfoma en un sujeto que lo necesita, donde los TDN se han expandido *in vitro* o *ex vivo*, y donde el uso comprende la administración de la una o más dosis adicionales al menos 3 días después de la última dosis de TDN.
- 10 3. Combinación de dosis de TDN para su uso según la reivindicación 2, donde el uso comprende la administración de la una o más dosis adicionales entre 3 días y dos semanas después de la última dosis de TDN.
4. Combinación para su uso según la reivindicación 1, donde el uso comprende además la administración de una o más dosis separadas adicionales de una cantidad eficaz de TDN.
- 15 5. Combinación para su uso según la reivindicación 4, donde la administración de la una o más dosis separadas adicionales es entre 3 días y dos semanas después de la última dosis de TDN, o al menos 3 días después de la última dosis de TDN.
6. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la leucemia es leucemia mielógena aguda (LMA).
- 20 7. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sujeto tiene LMA recurrente, recidivante o refractaria, opcionalmente donde la LMA recurrente o recidivante es causada por una enfermedad mínima residual (EMR) o células madre leucémicas.
8. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sujeto tiene leucemia o linfoma resistente a la quimioterapia.
- 25 9. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el uso comprende la administración de los TDN antes, durante o después del antineoplásico químico.
10. Combinación para su uso según la reivindicación 9, donde el uso comprende la administración de los TDN en el mismo día, dentro de 3 días, dentro de 1 semana, dentro de 2 semanas, dentro de 3 semanas o dentro de 1 mes que el antineoplásico químico.
- 30 11. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el uso comprende la administración de los TDN entre 2 días y 7 días después del antineoplásico químico.
12. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde los TDN expresan un receptor quimérico para el antígeno (CAR) que se une preferiblemente a una célula cancerosa, donde la célula cancerosa opcionalmente es una célula cancerosa leucémica.
- 35 13. Combinación para su uso según la reivindicación 12, donde los TDN expresan uno o más receptores que se unen a CD33, CD19, CD20, CD123 y/o LeY.
14. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el inhibidor del ciclo celular es doxorubicina, melfalán, roscovitina, mitomicina C, hidroxycarbamida, 5-fluorouracilo, cisplatino, citarabina (ara-C), etopósido, gemcitabina, bortezomib, sunitinib, sorafenib, ácido valproico, FR01228, tricostatina A, SAHA y PDX101, o dacarbazina.
- 40 15. Combinación para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde
- (i) el inhibidor del ciclo celular es citarabina (ara-C), 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 5-fluorouracilo, capecitabina, floxuridina, gemcitabina, decitabina, azacitidina (Vidaza®), fludarabina, nelarabina, cladribina, clofarabina, pentostatina, tiarabina, troxacitabina, sapacitabina o forodesina, o
- 45 (ii) el inhibidor del ciclo celular es un terminador de alargamiento de ADN, opcionalmente fludarabina, nelarabina, cladribina, clofarabina o un análogo de desoxicitidina tal como citarabina (ara-C).

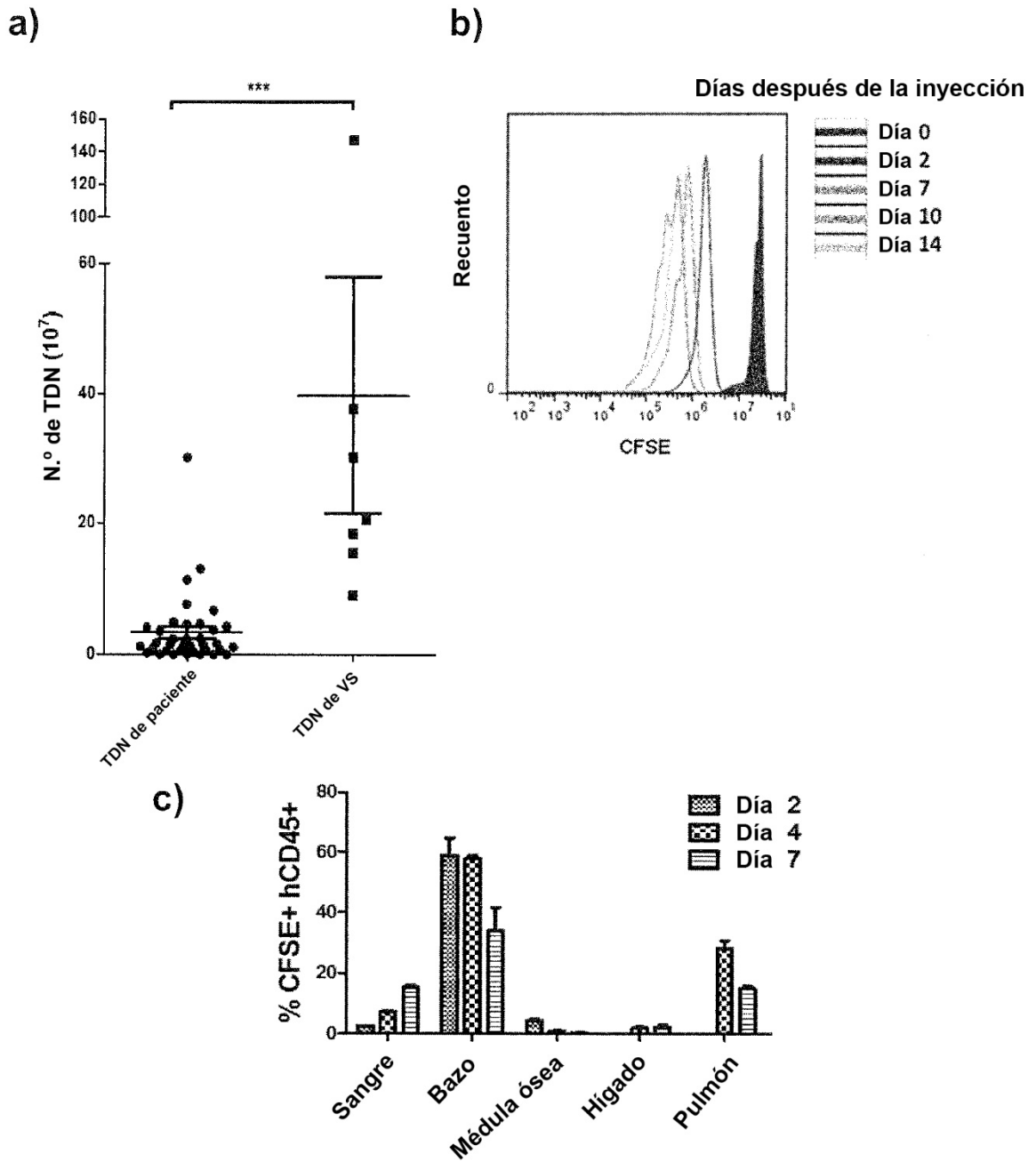


Fig. 1

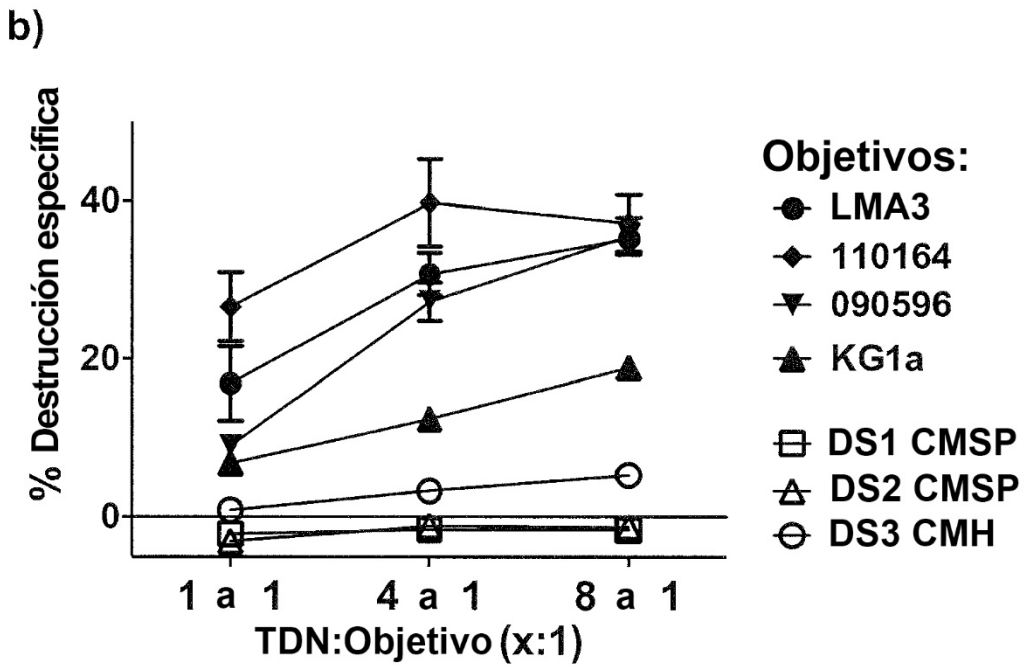
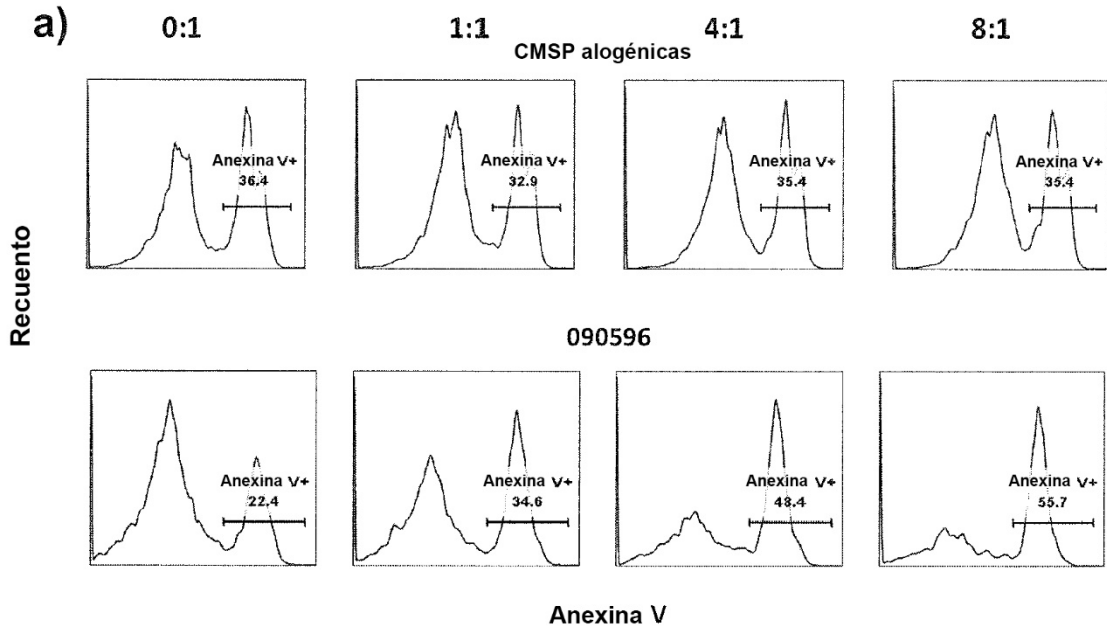


Fig. 2

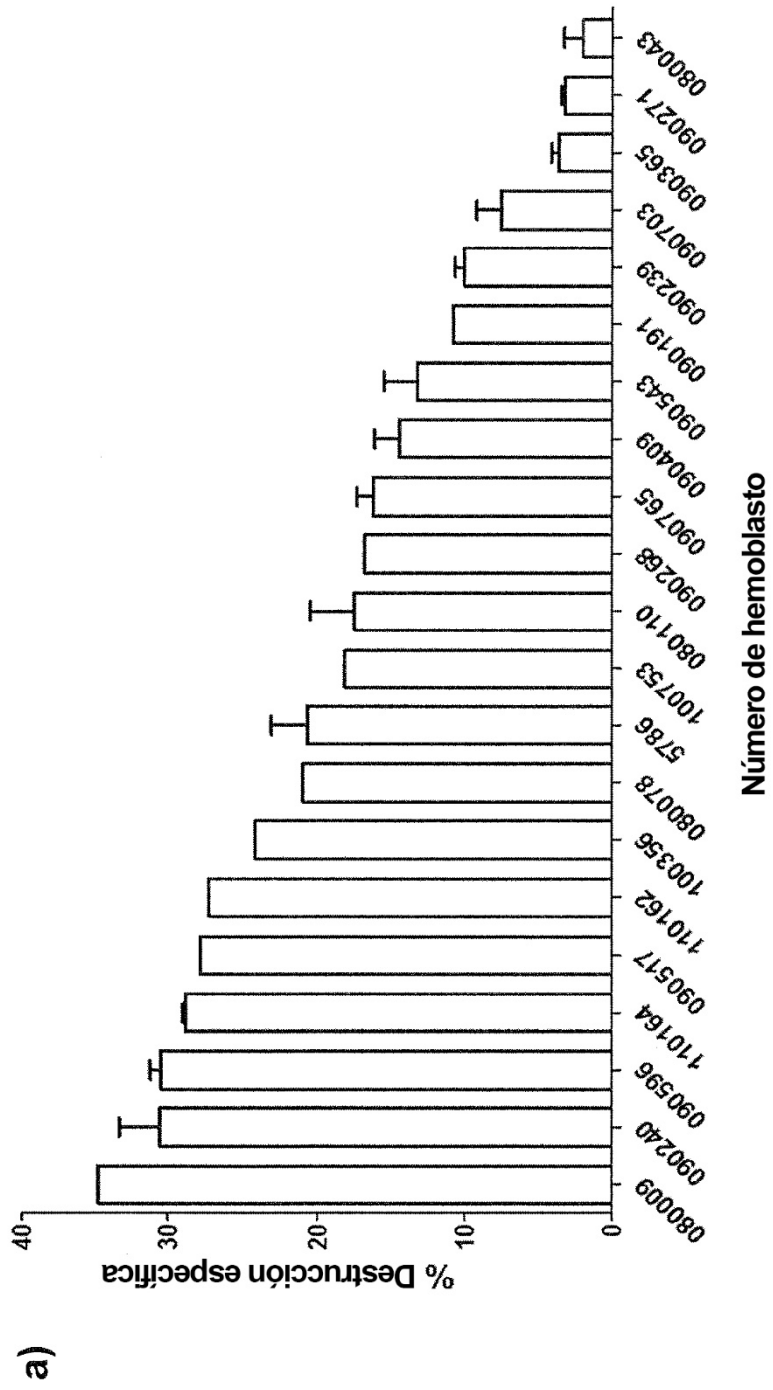


Fig.3

b)

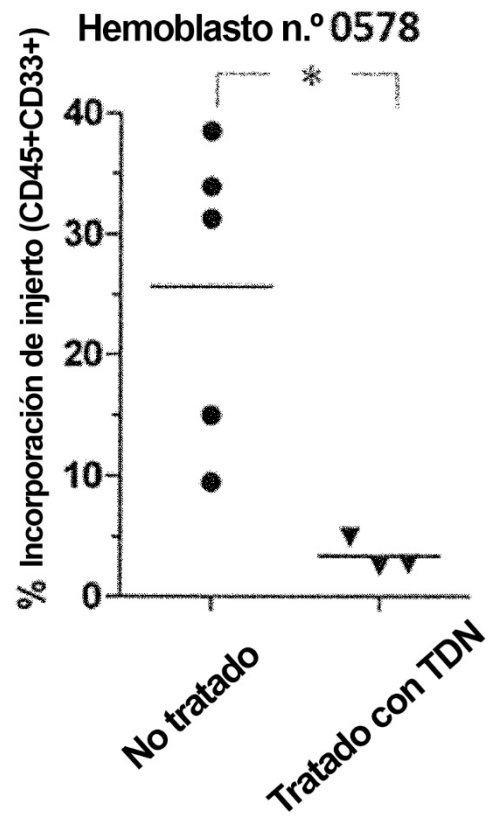
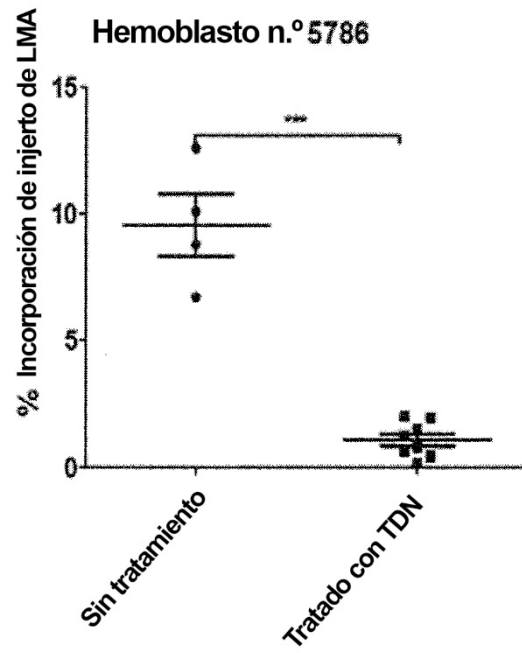


Fig. 3 (Cont.)

a)



b)

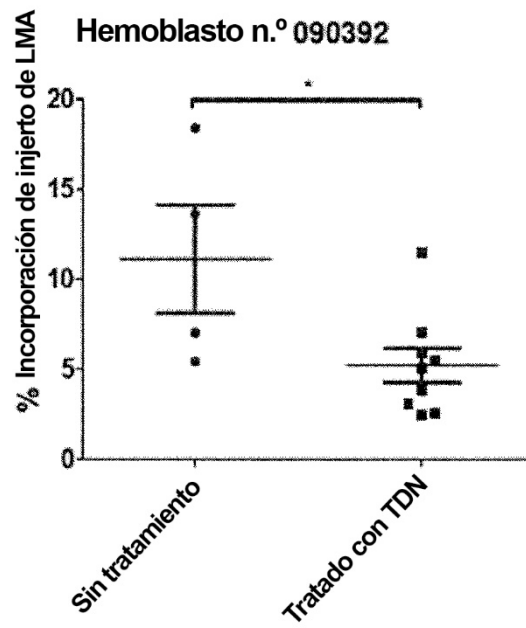


Fig. 4

a)

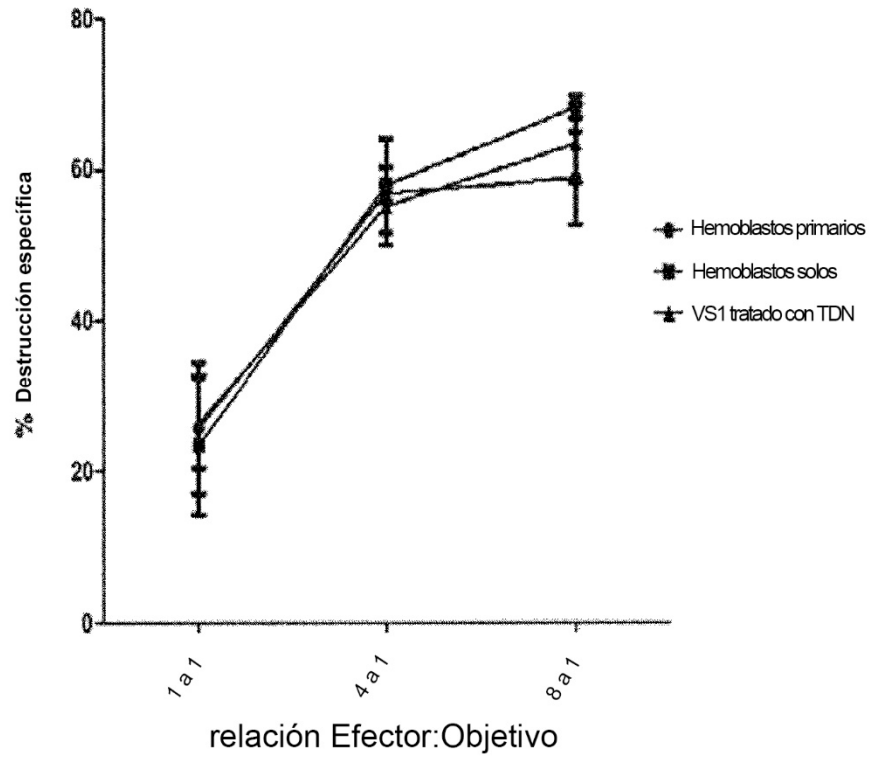


Fig. 5

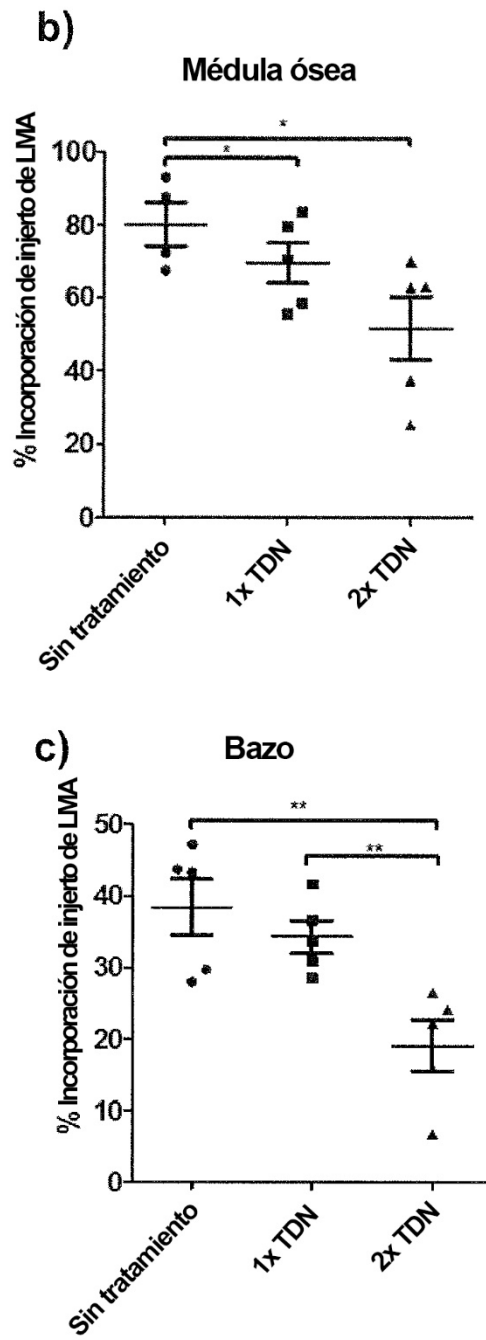


Fig. 5 (Cont.)

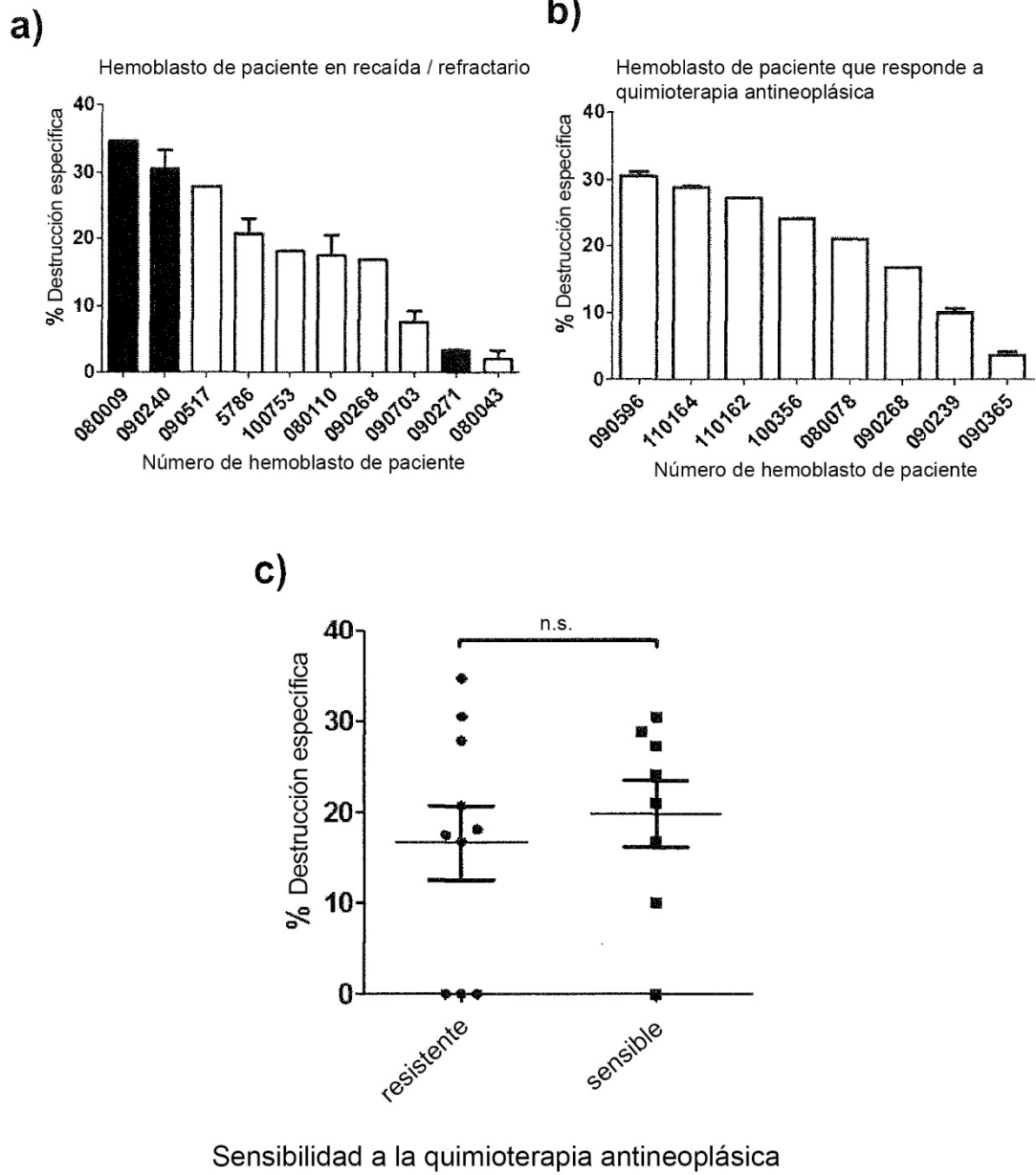


Fig. 6

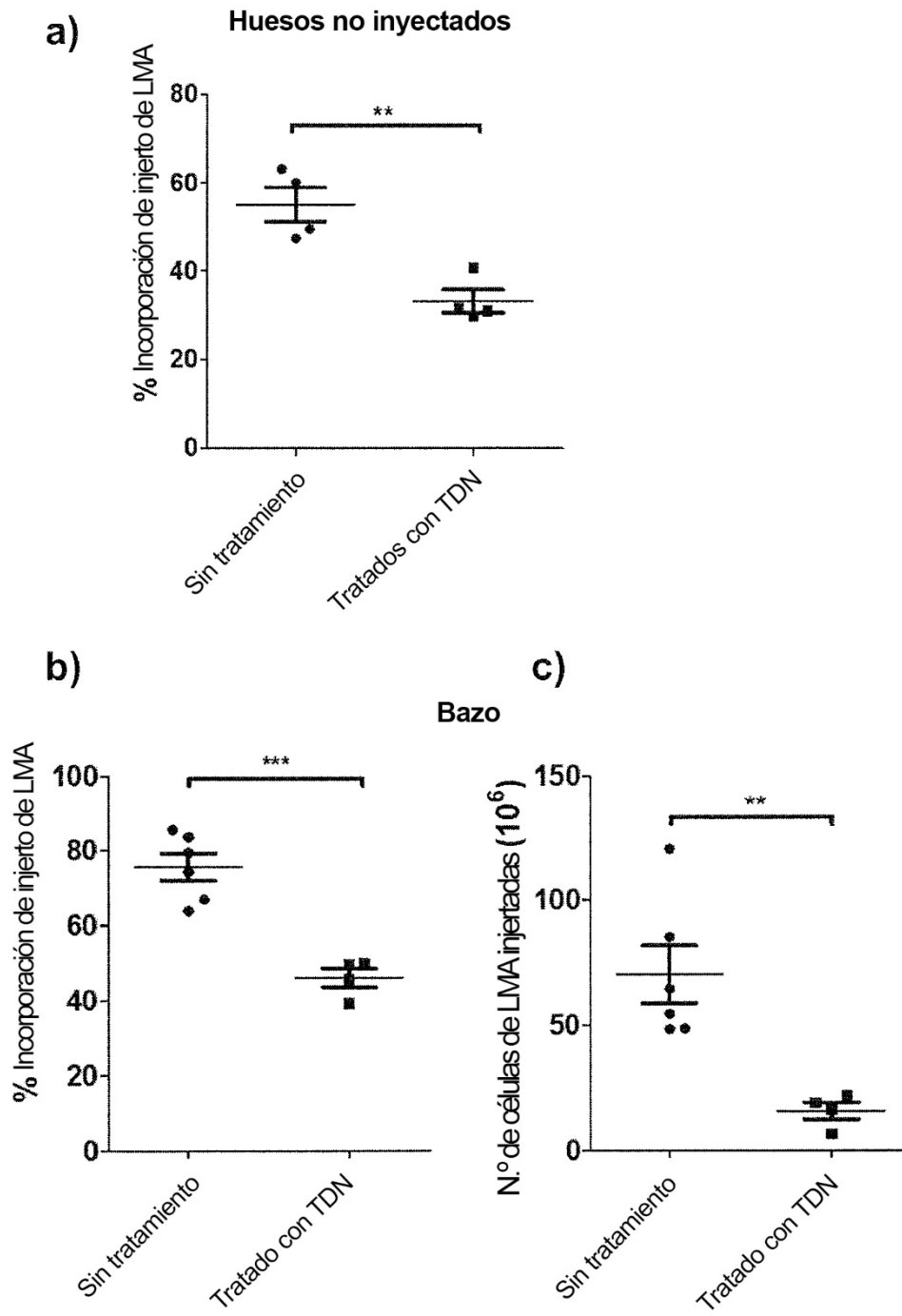


Fig. 7

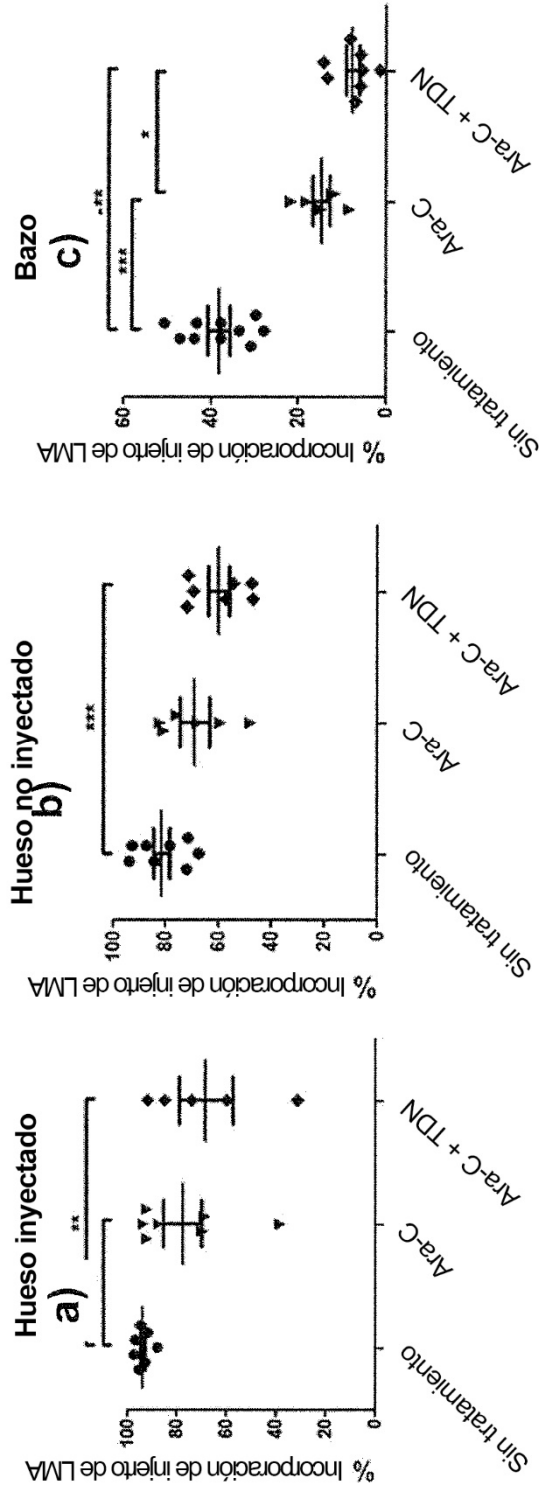
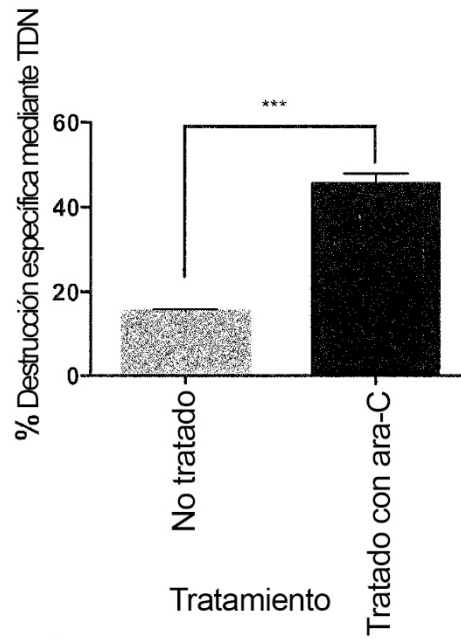


Fig. 8

a)



b)

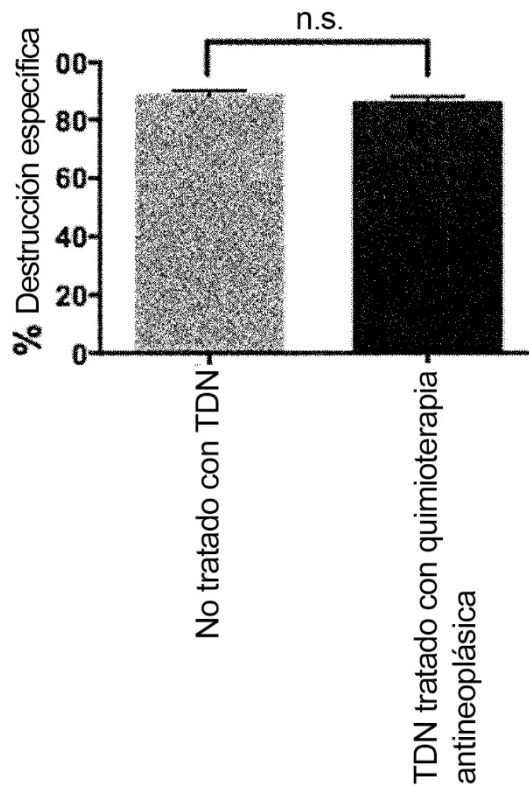


Fig. 9

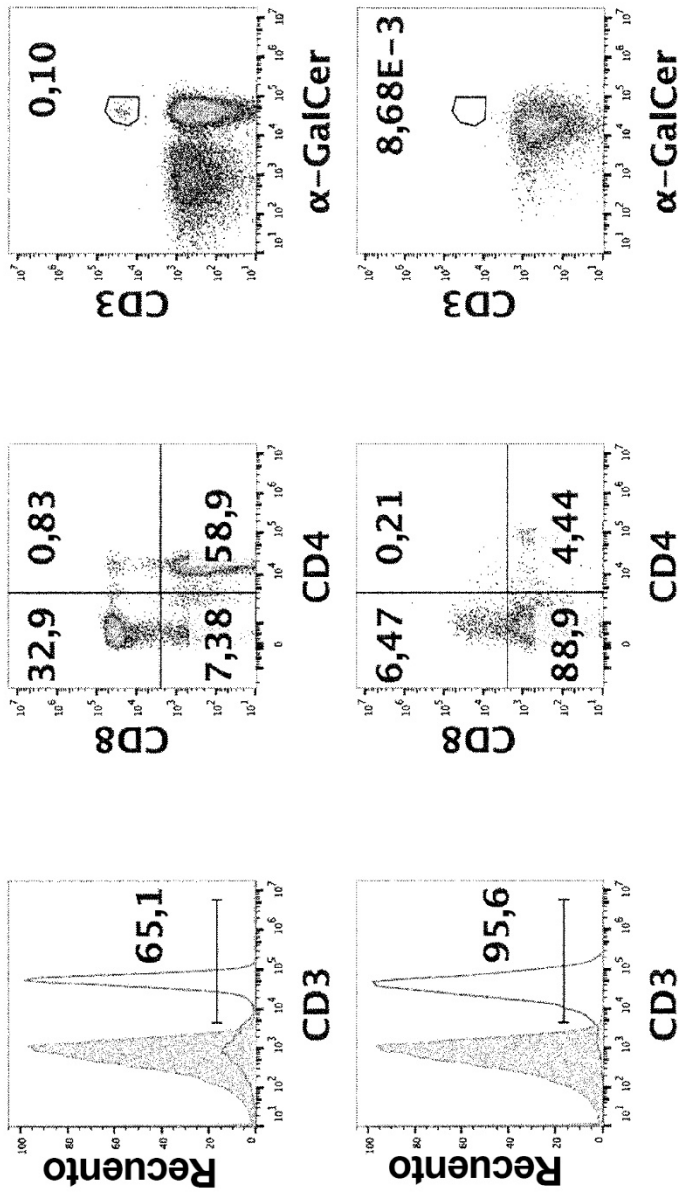


Fig. 10

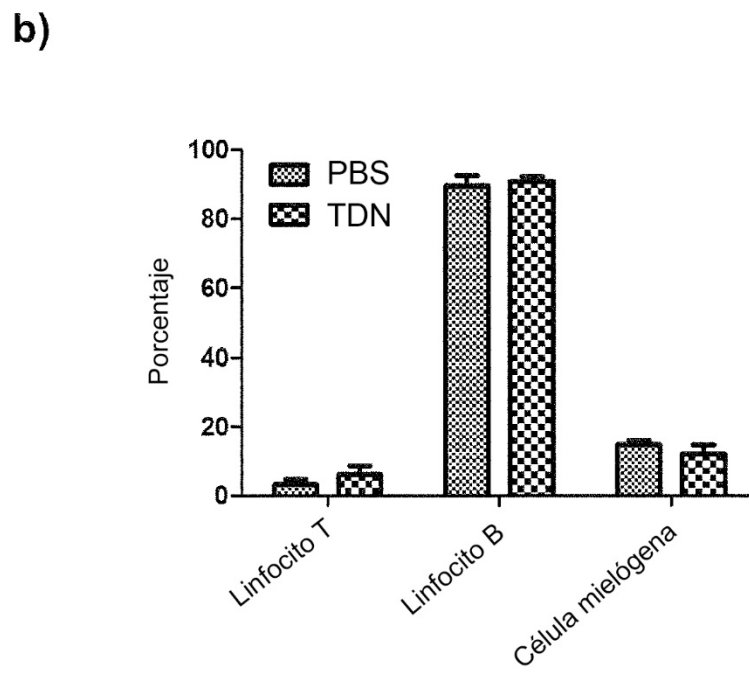
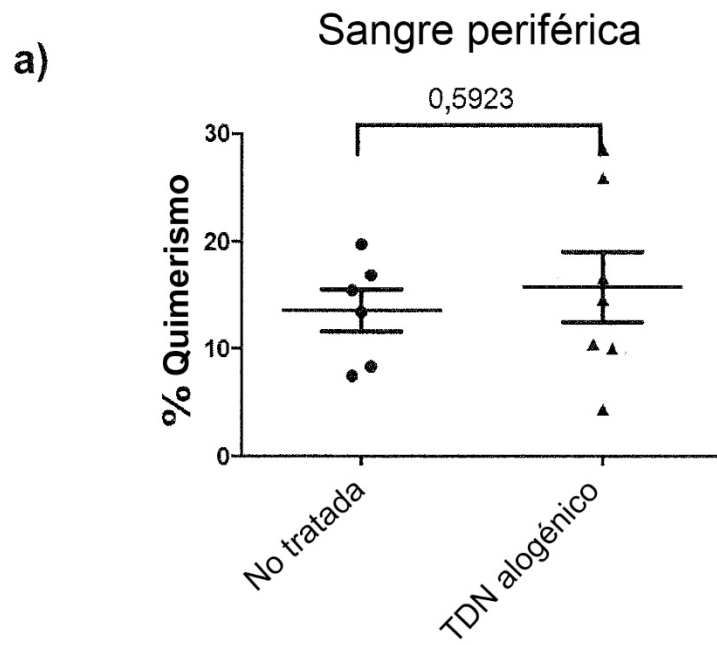


Fig. 11

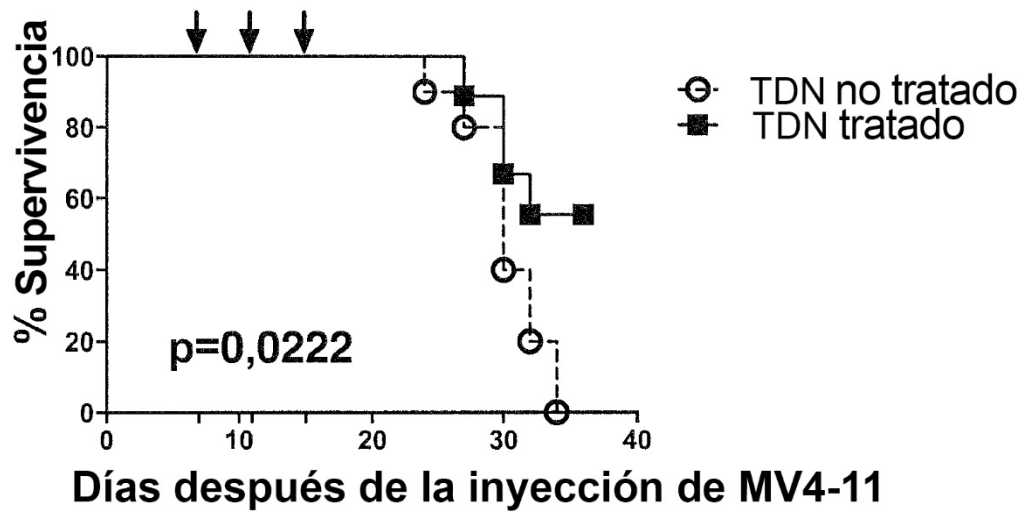


Fig. 12