

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 816**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 41/00 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2020** **PCT/EP2020/086733**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2021** **WO21122969**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2020** **E 20833822 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024** **EP 4077639**

54 Título: **Método para generar células inmunorreguladoras en una muestra derivada de sangre**

30 Prioridad:

20.12.2019 EP 19218724

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2024

73 Titular/es:

**MALLINCKRODT PHARMACEUTICALS IRELAND
LIMITED (100.0%)
College Business & Technology Park Cruiserath,
Blanchardstown
Dublin 15, IE**

72 Inventor/es:

**ZEISER, ROBERT;
APOSTOLOVA, PETYA y
DUYSTER, JUSTUS**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 985 816 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para generar células inmunorreguladoras en una muestra derivada de sangre

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para obtener linfocitos NK inmunorreguladores que comprende las etapas de proporcionar una muestra derivada de una muestra de sangre de un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control y muestra síntomas o padece acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE, por sus siglas en inglés) que comprenden colitis autoinmunitaria, añadir un agente fotosensibilizante a la muestra y someter la muestra a irradiación, lo que genera o induce la formación de linfocitos NK inmunorreguladores en dicha muestra. El agente fotosensibilizante es 8-metoxipsoraleno y la irradiación es irradiación UVA.

15 Antecedentes de la invención

Los puntos de control inmunitarios son moléculas reguladoras del sistema inmunitario y desempeñan una función importante en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria y la autotolerancia. Los primeros puntos de control inmunitarios que se identificaron incluyen la proteína 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1). CTLA-4 se expresa en la superficie de los linfocitos T, se une a las moléculas B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) en células presentadoras de antígenos y actúa como un regulador negativo de los linfocitos T. PD-1 también tiene un efecto negativo sobre la actividad de los linfocitos T a través de interacciones con sus ligandos, incluyendo el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) y el ligando 2 de muerte programada (PD-L2). A diferencia de CTLA-4, PD-1 no sólo se encuentra en los linfocitos T, sino que también se expresa ampliamente en muchas células inmunitarias, incluyendo los linfocitos B y los linfocitos citolíticos naturales. En individuos sanos, la expresión superficial de CTLA-4 y PD-1 está regulada estricta y dinámicamente.

Durante el desarrollo del cáncer, las células malignas inhiben la respuesta inmunitaria activando puntos de control inmunitarios. Estudios anteriores han demostrado que PD-L1 se expresa en una amplia gama de cánceres. En el microambiente tumoral, el PD-L1 expresado por células cancerosas interactúa con PD-1 en la superficie de los linfocitos T para inhibir la función efectora de los linfocitos T. Además, varios estudios han demostrado que la expresión tumoral elevada de PD-L1 se correlaciona significativamente con un mal pronóstico del carcinoma. Estos estudios sugieren que existe un efecto terapéutico del bloqueo de la vía de señalización de PD-1 en el cáncer.

Ensayos clínicos recientes han revelado que varios inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICI) anti-PD-1 y anti-PD-L1 son eficaces en una diversidad de cánceres, tales como melanoma, carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales y cáncer de cabeza y cuello. Actualmente se están realizando ensayos clínicos adicionales para ampliar la indicación de los ICI. Hasta la fecha, la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE. UU. (FDA) ha aprobado tres anticuerpos anti-PD-1, nivolumab, pembrolizumab y cemiplimab, y tres inhibidores anti-PD-L1, atezolizumab, avelumab y durvalumab, para los tratamientos de diferentes tipos de cáncer.

A medida que aumenta el uso de ICI, los acontecimientos adversos relacionados con esta clase de fármacos se han convertido en un problema importante. Los ICI tienen un perfil de toxicidad diferente al de la quimioterapia citotóxica convencional. Los efectos secundarios asociados al aumento de la actividad del sistema inmunitario por parte de los ICI, conocidos como acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE), pueden afectar a múltiples órganos del cuerpo, incluyendo la piel, el tracto gastrointestinal, el sistema endocrino, el hígado, el pulmón, los sistemas nerviosos y los sistemas musculoesqueléticos.

La terapia combinada con inhibidores de puntos de control inmunitarios, por ejemplo, con anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD-1 es un tratamiento eficaz de primera línea para el melanoma maligno. Sin embargo, aproximadamente el 50 % de los pacientes desarrollan acontecimientos adversos graves relacionados con el sistema inmunitario (irAE)^{1,2}. De hecho, la toxicidad inducida por inhibidores de puntos de control es bien conocida²⁰ y se han descrito estrategias para el manejo de los irAE asociados a terapias de puntos de control inmunitarios^{21,19}. La colitis autoinmunitaria se produce en el 20 % de los casos y puede volverse refractaria a los corticoesteroides³. Se ha descrito la fotoféresis extracorpórea (FEC) para el tratamiento de la colitis, aunque no la colitis inducida explícitamente por la terapia con inhibidores de puntos de control²².

En resumen, aunque la terapia con inhibidores de puntos de control, en particular con anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD-1, es un tratamiento eficaz para múltiples formas de cáncer, en particular el melanoma maligno, el tratamiento puede asociarse a efectos secundarios sustanciales que pueden dar como resultado la activación del sistema inmunitario debido al tratamiento con inhibidores de puntos de control. Dichos efectos secundarios pueden dar como resultado reacciones autoinmunitarias y manifestarse en diferentes síntomas clínicos y pueden resumirse como irAE. Un irAE destacado es la colitis autoinmunitaria. Los efectos secundarios del tratamiento, tales como las reacciones autoinmunitarias, en particular, la colitis autoinmunitaria, pueden persistir incluso después de suspender el tratamiento con inhibidores de puntos de control.

En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de medios alternativos o mejorados para tratar acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario, tales como reacciones autoinmunitarias y, en particular, la colitis autoinmunitaria, en un paciente que ha recibido terapia con inhibidores de puntos de control.

5 Sumario de la invención

A la luz de la técnica anterior, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar medios mejorados o alternativos para obtener linfocitos NK inmunorreguladores adecuadas para su uso en el tratamiento y/o la prevención de acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario, tales como reacciones autoinmunitarias y, en particular, la colitis autoinmunitaria, en un paciente que ha recibido terapia con inhibidores de puntos de control.

Este problema se resuelve mediante las características de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes proporcionan realizaciones preferidas de la presente invención.

La invención se refiere a un método para obtener linfocitos NK inmunorreguladores que comprende las etapas de

- proporcionar una muestra derivada de una muestra de sangre de un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control y muestra síntomas o padece acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) que comprenden colitis autoinmunitaria,
- añadir 8-metoxipsoraleno a la muestra y
- someter la muestra a irradiación UVA,
- en el presente documento añadir 8-metoxipsoraleno a la muestra y someter la muestra a radiación UVA genera o induce la formación de linfocitos NK inmunorreguladores en la muestra.

La presente invención se basa en el hallazgo totalmente sorprendente de que los pacientes que han recibido una terapia con inhibidores de puntos de control, por ejemplo, debido a una enfermedad cancerosa, que condujo a irAE, tal como, en particular, la colitis autoinmunitaria, pueden tratarse eficazmente aplicando FEC. La FEC que se usó en los ejemplos corresponde básicamente a un método de adición de un agente fotosensibilizante (8-metoxipsoraleno) a una muestra derivada de sangre de un paciente con irAE y someter la muestra a irradiación UVA. Sorprendentemente, se descubrió que realizar este método en una muestra de sangre, tal como, en particular, una muestra de sangre que comprende células mononucleares (MNC, por sus siglas en inglés), conduce a la generación de linfocitos NK inmunorreguladores en dicha muestra. En este contexto, por "generación de" linfocitos NK inmunorreguladores se entiende la inducción de o inducir la formación de dichas células en la muestra. En otras palabras, las células que están comprendidas en la muestra se diferencian en o adoptan un fenotipo de linfocitos NK inmunorreguladores.

Se descubrió que la muestra resultante del método de la invención y, en particular, los linfocitos NK inmunorreguladores inducidos comprendidos por la muestra son útiles para el tratamiento de pacientes con irAE. Sorprendentemente, pudo demostrarse que la administración de una muestra de este tipo o células comprendidas en una muestra de este tipo que se sometió al método de la invención a un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control es eficaz para prevenir la aparición de irAE e incluso en el tratamiento de un irAE que ya está establecido en el sujeto. Es importante destacar que el método de la invención puede realizarse en una muestra del mismo sujeto que ha recibido la terapia con inhibidores de puntos de control. Por lo tanto, las células o la muestra resultante del método de la invención pueden administrarse al mismo sujeto que sirvió como donante de sangre y, por lo tanto, la muestra resultante puede representar una terapia celular autóloga.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sujeto que ha recibido terapia con inhibidores de puntos de control" incluye sujetos que actualmente están en terapia con inhibidores de puntos de control en curso, o sujetos que han recibido una terapia con inhibidores de puntos de control que se suspendió, por ejemplo, después de que se produjeran síntomas de irAE.

Fue totalmente inesperado, que dicha terapia celular usando una muestra o células resultantes del método de la invención fuese incluso eficaz para pacientes con irAE que son refractarios a otras terapias inmunosupresoras, tales como esteroides o anticuerpos anti-TNF, y que continúan mostrando síntomas o todavía padecen irAE después de suspender el tratamiento con inhibidores de puntos de control.

Como se muestra en los ejemplos, el efecto positivo y la eficacia de la administración de una muestra que se sometió al método de la invención pueden deberse al menos parcialmente a una modulación de la función de los linfocitos NK comprendidos en la muestra, en donde dicha modulación es el resultado de la irradiación UVA en presencia de un agente fotosensibilizante (8-metoxipsoraleno). Por lo tanto, también se describen linfocitos NK inmunomoduladores para su uso en el tratamiento y/o la prevención de acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) en un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control. Los linfocitos NK inmunomoduladores pueden generarse sometiendo sangre o MNC o linfocitos NK de una persona, tal como un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control y se sospecha que desarrolla o ha desarrollado irAE, al método de la presente invención, y puede usarse posteriormente para tratar a un sujeto que ha

recibido una terapia con inhibidores de puntos de control y se sospecha que desarrolla o ha desarrollado irAE, que es preferentemente el donante.

Los presentes inventores han observado que los linfocitos NK comprendidos en una muestra derivada de sangre que se sometió a irradiación UVA después de añadir un agente fotosensibilizante (8-metoxipsoraleno) adoptan un fenotipo inmunorregulador que resulta ventajoso cuando se usan las células resultantes en el tratamiento y/o la prevención de irAE. Dichas propiedades ventajosas y beneficiosas no se han observado hasta ahora en ningún otro linfocito NK en este contexto.

Preferentemente, los sujetos son humanos. Preferentemente, las muestras de sangre y las células son humanas.

La muestra de sangre utilizada para generar los linfocitos NK inmunorreguladores proviene de un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control y muestra síntomas o padece acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE). Esto es particularmente ventajoso, puesto que las células son autólogas de dicho paciente y no habrá acontecimientos adversos que puedan producirse tras el trasplante de células heterólogas.

También se describen linfocitos NK inmunorreguladores para su uso en el tratamiento y/o la prevención de acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) en un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control. Esto incluye sujetos que actualmente están en terapia con inhibidores de puntos de control en curso, o sujetos que han recibido una terapia con inhibidores de puntos de control que se suspendió, por ejemplo, después de que se produjeran síntomas de irAE.

Los linfocitos NK inmunorreguladores para su uso en dicho tratamiento o prevención pueden haberse generado añadiendo un agente fotosensibilizante a una muestra derivada de una muestra de sangre de un sujeto humano y sometiendo la muestra a irradiación.

Añadir un agente fotosensibilizante a la muestra derivada de sangre y someter la muestra a irradiación genera o induce (la formación de) linfocitos NK inmunorreguladores en dicha muestra.

El agente fotosensibilizante es 8-metoxipsoraleno. Además, la irradiación es irradiación UVA.

En el contexto de la invención, la irradiación se realiza preferentemente por medio de un sistema de fotoféresis extracorpórea (FEC). La irradiación de la muestra de sangre puede realizarse usando cualquier sistema o dispositivo de irradiación adecuado conocido por el experto.

El método de la invención se realiza *in vitro* o *ex vivo*. Como se usan en el presente documento, las expresiones *in vivo* y *ex vivo* se usan como sinónimos. En el contexto de la presente divulgación, los términos se refieren a un método que se realiza en una muestra derivada de sangre que se ha extraído del cuerpo humano, en donde el método de la invención se realiza en la muestra derivada de sangre fuera del cuerpo humano. Para este fin, la sangre de un sujeto donante se extrae del cuerpo, lo que significa fuera del sistema circulatorio fisiológico. Como se usa en el presente documento, una "muestra de sangre aislada" es una muestra de sangre (es decir, un determinado volumen de sangre) que se extrae del sistema circulatorio del donante a un lugar fuera del cuerpo de la persona.

Dicha muestra de sangre aislada puede someterse o introducirse en un sistema de fotoféresis extracorpórea (FEC) o en un sistema de aféresis para realizar al menos determinadas etapas del método de la invención. En esto, un sistema de este tipo puede ser un sistema en línea que está en conexión fluida con el sistema circulatorio sanguíneo del sujeto. En realizaciones alternativas, el método puede realizarse sin conexión, en donde la muestra derivada de sangre que se somete a irradiación se desconecta del sistema circulatorio del sujeto donante.

En consecuencia, el método de la invención es un método *in vitro*. En realizaciones del método de la invención, la muestra de sangre es una muestra de sangre aislada. En realizaciones, el método es un método *in vitro* y la muestra de sangre es una muestra de sangre aislada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra de sangre" comprende todo tipo de muestras derivadas de sangre, incluyendo muestras de células sanguíneas, tales como muestras de MNC que se generan a partir de sangre.

El sujeto (el donante de sangre y/o receptor de células) muestra síntomas de o padece irAE. En realizaciones de la invención, el sujeto ha recibido terapia con inhibidores de puntos de control, pero la terapia con inhibidores de puntos de control se suspendió después de que se produjesen síntomas y/o manifestaciones de irAE en dicho sujeto. Es posible que se hayan producido síntomas y/o manifestaciones de irAE en el sujeto después de que se suspendiese la terapia con inhibidores de puntos de control. Los síntomas y/o manifestaciones de irAE pueden haberse mantenido después de que se suspendiese la terapia con inhibidores de puntos de control.

Cuando el sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control y se sospecha que desarrolla o ha

desarrollado síntomas de irAE sirve como donante de sangre, la provisión y/o el aislamiento de la muestra de sangre pueden producirse en cualquiera de los puntos temporales descritos en las realizaciones anteriores. Por ejemplo, el aislamiento de la muestra puede producirse antes o después del desarrollo de los síntomas del irAE. Además, el aislamiento de la muestra puede producirse durante la terapia con inhibidores de puntos de control o después de la interrupción de dicha terapia.

La muestra resultante del método de la invención o los linfocitos NK para su uso en el tratamiento y/o la prevención de acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) puede administrarse al sujeto mientras la terapia con inhibidores de puntos de control está en curso.

En realizaciones preferidas, el aislamiento de la muestra se produce durante la terapia con inhibidores de puntos de control en curso, ya sea antes o después de la aparición de los síntomas de irAE. La muestra o células resultantes del método de los ejemplos pueden usarse preventiva o terapéuticamente administrando la muestra/células al sujeto durante la terapia con inhibidores de puntos de control en curso. En consecuencia, el sujeto que ha recibido terapia con inhibidores de puntos de control puede recibir linfocitos NK inmunorreguladores, que son preferentemente autólogos y se han generado irradiando una muestra derivada de sangre de acuerdo con el método descrito en el presente documento, mientras esté en curso la terapia con inhibidores de puntos de control. Dicho tratamiento puede ser particularmente ventajoso, puesto que la terapia con inhibidores de puntos de control, tal como una terapia con inhibidores de puntos de control contra el cáncer, puede mantenerse, mientras el paciente recibe células resultantes del método de la invención.

En consecuencia, se puede administrar al sujeto una terapia con inhibidores de puntos de control durante un período de tiempo más prolongado, puesto que la administración de las células irradiadas previene la aparición de irAE o mejora la irAE de manera que pueda continuar la terapia con inhibidores de puntos de control. Sorprendentemente se pudo demostrar que la administración de dichas células resultantes del método de la invención, en particular, linfocitos NK inmunomoduladores, no interfiere con la respuesta contra el cáncer del sujeto a la terapia con inhibidores de puntos de control. Esto representa una ventaja importante en comparación con tratamientos/medidas preventivas conocidas de irAE, en particular, la administración de fármacos inmunosupresores, tales como los corticoesteroides. Sorprendentemente, resultó que la realización de FEC no alteró notablemente el efecto contra el cáncer de la terapia con inhibidores de puntos de control, mientras que la administración paralela de glucocorticoides (clase específica de corticoesteroides), en particular prednisolona, dio como resultado un peor resultado, lo que indica una eficacia reducida del tratamiento con inhibidores de puntos de control.

Además, cuando una muestra derivada de sangre (humana) que se sometió a un método de añadir un agente fotosensibilizante a la muestra y someter la muestra a irradiación se usa en el tratamiento y/o la prevención de irAE en un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control, independientemente de la fuente de la muestra derivada de sangre (autóloga o heteróloga), puede producirse la administración de la muestra o las células resultantes de un método de este tipo, por ejemplo, antes o después del desarrollo de síntomas de irAE, y/o durante la terapia con inhibidores de puntos de control o después de la interrupción de la terapia con inhibidores de puntos de control.

El irAE (de un donante de sangre y/o de un receptor de células) comprende la colitis autoinmunitaria.

En realizaciones, el sujeto (donante de sangre y/o receptor de células) padece cáncer, tal como un melanoma maligno u otro cáncer tratable mediante terapia con inhibidores de puntos de control.

En realizaciones, el sujeto está recibiendo fármacos inmunosupresores, tales como esteroides, corticoesteroide, ciclosporina y/o anticuerpos anti-TNF (por ejemplo, infliximab) y/o es refractario a fármacos inmunosupresores.

Fue totalmente sorprendente, que la administración de linfocitos NK inmunorreguladores resultado de los métodos descritos en el presente documento, tuviese un efecto terapéutico en pacientes con irAE que son refractarios a fármacos inmunosupresores que se han administrado para tratar los síntomas de irAE. Para dichos pacientes, no existe ningún tratamiento eficaz disponible para mejorar los síntomas de irAE y, por lo tanto, los linfocitos NK inmunorreguladores obtenidos mediante el método de la presente invención representan una posibilidad totalmente inesperada de tratar irAE en estos pacientes.

En realizaciones, la terapia con inhibidores de puntos de control comprende la administración de al menos uno de entre anticuerpos anti-CTLA4 y anticuerpos anti-PD-1.

Los linfocitos NK inmunorreguladores para su uso en el tratamiento y/o la prevención de irAE en un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control pueden ser autólogos con respecto a dicho sujeto. Como alternativa, los linfocitos NK pueden ser heterólogos con respecto a dicho sujeto.

Los linfocitos NK inmunorreguladores para su uso en el tratamiento y/o la prevención de acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) pueden administrarse tras la aparición de los síntomas de irAE. Las células pueden administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28,

30, 35, 40, 45 o 50 semanas después de la aparición de los síntomas de irAE. Opcionalmente, los linfocitos NK inmunorreguladores pueden administrarse durante la terapia con inhibidores de puntos de control en curso o después de que se suspendiese la terapia con inhibidores de puntos de control.

Los linfocitos NK inmunorreguladores pueden administrarse al menos una vez al sujeto, o al menos dos veces, opcionalmente en días consecutivos. En consecuencia, el sujeto puede recibir más de una dosis de linfocitos NK, en donde opcionalmente no se administra más de una dosis por día. Como alternativa, el sujeto puede recibir al menos 2, 3, 4 o 5 dosis de linfocitos NK. Los linfocitos NK inmunorreguladores pueden administrarse al sujeto al menos cada 8 semanas, preferentemente cada 2-4 semanas.

La presente invención se basa en el hallazgo totalmente sorprendente de que los pacientes que han recibido una terapia con inhibidores de puntos de control, por ejemplo, debido a una enfermedad cancerosa, que condujo a irAE, tal como, en particular, la colitis autoinmunitaria, pueden tratarse eficazmente aplicando FEC. Esto es válido incluso para pacientes que son refractarios a otras terapias inmunosupresoras, tales como esteroides o anticuerpos anti-TNF, y que continúan mostrando síntomas o todavía padecen irAE después de suspender el tratamiento con inhibidores de puntos de control.

Sorprendentemente, resultó que el efecto positivo y la eficacia del tratamiento con FEC era resultado, en particular, de la modulación de la función de los linfocitos NK después de la FEC. En consecuencia, se describen linfocitos NK inmunomoduladores para su uso en el tratamiento y/o la prevención de acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) en un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control, particularmente en donde los linfocitos NK inmunomoduladores se generaron mediante el método de la presente invención.

Todas las características divulgadas en el contexto del sistema de FEC para su uso en el tratamiento y/o la prevención de acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) en un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control también se refieren a y se divulgan con el presente documento también en el contexto del método *in vitro* de la invención, y los linfocitos NK para su uso en el tratamiento y/o la prevención de acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) en un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control, y viceversa.

Para evitar cualquier duda, cualesquier referencias en el presente documento a métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o a un diagnóstico *in vivo* han de interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos para su uso en esos métodos.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se divulgan métodos que comprenden las etapas de proporcionar una muestra derivada de una muestra de sangre de un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control y muestra síntomas o padece acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) que comprenden colitis autoinmunitaria, añadir un agente fotosensibilizante, 8-metoxipsoraleno, a la muestra y someter la muestra a irradiación UVA para generar o inducir la formación de linfocitos NK inmunorreguladores en la muestra. La irradiación de la muestra de sangre puede realizarse usando cualquier sistema o dispositivo de irradiación UVA adecuado conocido por el experto. Preferentemente, la irradiación UVA se realiza por medio de un sistema de fotoféresis extracorpórea (FEC).

Irradiación y fotoféresis extracorpórea (FEC)

La fotoféresis, o fotoféresis extracorpórea o FEC, es una forma de aféresis y terapia fotodinámica en la que la sangre se trata con un agente fotosensibilizante y posteriormente se irradia con longitudes de onda de luz específicas para lograr un efecto. Por ejemplo, la capa leucocitaria (GB + plaquetas) puede separarse de la sangre completa, tratarse químicamente con 8-metoxipsoraleno (instilado en una bolsa de recogida o administrado por vía oral con antelación), exponerse a luz ultravioleta (UVA) y devolverse al paciente. El 8-metoxipsoraleno activado reticula el ADN en las células expuestas, dando como resultado en última instancia la apoptosis de las células nucleadas. Los linfocitos T dañados fotoquímicamente devueltos al paciente parecen inducir efectos citotóxicos sobre la formación de linfocitos T.

La fotoféresis que implica 8-metoxipsoraleno se describió por primera vez en una publicación del *New England Journal of Medicine* de 1987 (Edelson, R, *et al.* (1987). "Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results". *New England Journal of Medicine*. 316 (6): 297-303). La fotoféresis es actualmente una terapia convencional aprobada por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE. UU. (FDA) para el linfoma cutáneo de linfocitos T. La evidencia sugiere que este tratamiento podría ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador. La fotoféresis también se ha utilizado satisfactoriamente en el tratamiento de la epidermólisis ampollosa adquirida cuando todos los demás tratamientos han resultado ineficaces.

La FEC, como se usa en el presente documento, comprende terapia de irradiación de sangre con rayos UVA.

La terapia de irradiación de sangre es un procedimiento en el que la sangre se expone a una luz roja de nivel bajo (con frecuencia luz láser) por razones terapéuticas. La terapia de irradiación de sangre puede administrarse de tres maneras. Por vía extracorpórea, extrayendo sangre e irradiándola en una cubeta especial. Este método se usa para la irradiación de sangre con luz ultravioleta (UV) (UVBI, por sus siglas en inglés) mediante lámparas UV. La luz láser es monocromática, es decir, tiene una longitud de onda de manera que permite introducir luz en la fibra óptica y realizar la irradiación por vía intravenosa a través de un catéter en una vena. Este método es más simple y eficaz. La terapia de irradiación de sangre también se administra por vía externa a través de la piel en la proyección de grandes vasos sanguíneos.

La irradiación sanguínea con láser intravenosa o intravascular (ILBI, por sus siglas en inglés) implica la iluminación *in vivo* de la sangre alimentando luz láser de nivel bajo generada por un láser de helio-neón de 1-3 mW a una longitud de onda de 632,8 nm en un canal vascular, por lo general una vena en el antebrazo, bajo el supuesto de que cualquier efecto terapéutico circulará a través del sistema circulatorio. Con la máxima frecuencia se usan longitudes de onda de 365, 405, 525 y 635 nm y una potencia de 2,3 mW. La técnica se usa ampliamente en la actualidad en Rusia, menos en Asia y no extensamente en otras partes del mundo. Está demostrado que la ILBI mejora el flujo sanguíneo y sus actividades de transporte, por lo tanto, el trofismo tisular, tiene un efecto positivo sobre el sistema inmunitario y el metabolismo celular. Esta cuestión está sujeta a escepticismo. Se han hecho llamamientos para que se investigue más sobre este tema. La terapia transcutánea aplica luz láser sobre la piel intacta en áreas con una gran cantidad de vasos sanguíneos (tales como el antebrazo). Debido a que la piel actúa como barrera para la sangre, absorbiendo energía láser de bajo nivel, la potencia del láser con frecuencia se refuerza para compensar. El problema puede resolverse usando fuentes de luz láser de matriz pulsada. La irradiación extracorpórea se usa únicamente para la irradiación de sangre con luz ultravioleta, que implica extraer sangre a través de una vena e irradiarla fuera del cuerpo. Aunque se promociona como tratamiento para el cáncer, una revisión de 1952 en el *Journal of the American Medical Association* y otra revisión de la American Cancer Society en 1970 concluyeron que el tratamiento era ineficaz.

La fotoféresis extracorpórea (FEC), también conocida como fotoimmunoterapia extracorpórea o fotoquimioterapia, es una terapia basada en leucocitaféresis que se usó inicialmente en pacientes con linfoma cutáneo de linfocitos T (LCLT). Específicamente, para el tratamiento de pacientes con LCLT refractarios a la terapia que padecen la variante leucémica, el síndrome de Sézary, la FEC recibió la aprobación de la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos) en 1988. Durante la FEC, la sangre completa del paciente se recoge a través de una vena cubital o de un catéter implantado permanentemente, para la separación de leucocitos del plasma y células no nucleadas. Con un dispositivo construido específicamente para este procedimiento, los leucocitos recogidos, la denominada capa leucocitaria, después se exponen a irradiación ultravioleta-A (UVA) en presencia de un agente fotosensibilizante, 8-metoxipsoraleno antes de la reinfusión al paciente.

Se han descrito dos métodos básicamente diferentes para realizar el procedimiento de FEC. Difieren en el dispositivo utilizado para la recogida de leucocitos y la irradiación UVA: el "sistema cerrado" y el denominado "sistema abierto". El sistema cerrado se basa en el diseño original de Edelson y compañeros de trabajo y es el único sistema aprobado por la FDA. El sistema abierto es un sistema que incorpora diferentes instrumentos de separación, utilizado principalmente fuera de los Estados Unidos. Aunque la FEC es un método de tratamiento válido desde hace 30 años y se han realizado más de 2 millones de tratamientos, no hay informes sobre efectos citogenéticos negativos.

Las indicaciones para iniciar la FEC se ampliaron continuamente desde su introducción. Los tratamientos con FEC generalmente son bien tolerados por los pacientes y casi no presentan efectos secundarios no deseados significativos. En conjunto, la FEC combina un excelente perfil de seguridad con eficacia.

La fotoféresis extracorpórea (también denominada en ocasiones fotoquimioterapia extracorpórea) es un proceso que incluye: (1) recogida de células mononucleares (MNC) de un paciente, (2) tratamiento de fotoactivación de las células MNC recogidas; y (3) reinfusión de las células tratadas (MNC) de nuevo al paciente. Más específicamente, la FEC implica la exposición extracorpórea de células mononucleares de sangre periférica combinadas con un compuesto fotoactivo, tal como 8-metoxipsoraleno o "8-MOP" que después se fotoactiva con luz ultravioleta, seguida de la reinfusión de las células mononucleares tratadas. Se cree que la combinación de 8-MOP y radiación UV provoca apoptosis o muerte celular programada de los linfocitos T tratados con FEC.

Aunque no se conoce totalmente el mecanismo de acción preciso en el tratamiento con FEC (en las diferentes patologías), de acuerdo con las primeras teorías, se creía que la fotoactivación provoca que 8-MOP se una de forma covalente e irreversible a las cadenas de ADN contenidas en el núcleo de los linfocitos T. Cuando los linfocitos T dañados fotoquímicamente se reinfunden, se inducen efectos citotóxicos. Por ejemplo, un linfocito T citotóxico o "célula CD8+" libera citotoxinas cuando se expone a células infectadas o dañadas o ataca de otro modo a las células que portan determinadas moléculas extrañas o anómalas en sus superficies. Las citotoxinas se dirigen a la membrana de la célula dañada y entran en la célula diana, lo que en última instancia conduce a la apoptosis o muerte celular programada de la célula diana. En otras palabras, después de que las células mononucleares

tratadas se devuelven al cuerpo, el sistema inmunitario reconoce las células anómalas moribundas y comienza a producir linfocitos sanos (linfocitos T) para luchar contra esas células.

Además de lo anterior, también se ha teorizado que la fotoféresis extracorpórea también induce a los monocitos (un tipo de célula mononuclear) a diferenciarse en células dendríticas capaces de fagocitar y procesar los antígenos de linfocitos T apoptóticos. Cuando estas células dendríticas activadas se reinfunden en la circulación sistémica, pueden provocar una respuesta inmunitaria sistémica mediada por linfocitos T CD8+ citotóxicos a los antígenos de linfocitos T apoptóticos procesados como la descrita anteriormente. Se apreciará que pueden estar implicados otros posibles mecanismos de acción en la consecución de los beneficios que se han observado en el tratamiento con FEC de células mononucleares y los beneficios posteriores para los pacientes sometidos a terapias basadas en FEC.

Más recientemente, se ha postulado que la FEC puede dar como resultado una respuesta inmunitaria tolerante en el paciente. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de injerto contra hospedador, la infusión de células apoptóticas puede estimular la generación de linfocitos T reguladores, inhibir la producción de citocinas inflamatorias, provocar la supresión de linfocitos T eficaces y dar como resultado otras respuestas. Véase Peritt, "*Potential Mechanisms of Photopheresis in Hematopoietic Stem Cell Transplantation*", *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 12:7-12 (2006). Aunque actualmente la teoría de una respuesta inmunitaria tolerante parece estar entre las principales explicaciones, existen otras teorías en cuanto al mecanismo de acción de la FEC con respecto a la enfermedad de injerto contra hospedador, así como otras patologías.

Los sistemas para realizar FEC incluyen, por ejemplo, el sistema de fotoféresis UVAR XTS y el sistema de fotoféresis CellEx disponibles en Therakos, Inc., de Exton, Pa. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre cómo realizar FEC en el sistema Therakos, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. N.º 5.984.887.

Actualmente existen dos métodos utilizados habitualmente para realizar fotoféresis: sistemas y métodos en línea y fuera de línea.

En los métodos en línea, se usa un dispositivo de fotoféresis dedicado, tal como el dispositivo Therakos mencionado anteriormente, para realizar toda la terapia, incluyendo la reinfusión de las MNC tratadas. Dichos dispositivos son dispositivos de fotoféresis "dedicados", diseñados únicamente para realizar fotoféresis y no puede realizar otros protocolos de recogida necesarios en un hospital o entorno de procesamiento de sangre, incluyendo, por ejemplo, protocolos de aféresis multifuncionales para la recogida de plaquetas, plasma, GR, granulocitos y/o realizar protocolos de intercambio de plasma/GR.

En los métodos de fotoféresis fuera de línea, puede usarse un dispositivo de aféresis multifuncional para recoger células mononucleares. Las MNC recogidas, normalmente contenidas en uno o más recipientes de recogida, se cortan o se separan de otro modo del conjunto de tubos utilizado durante la recogida, donde después se tratan en un dispositivo de irradiación o luz UVA separado seguido de la reinfusión manual de las células tratadas a un paciente. Sin embargo, durante dichos métodos fuera de línea, cuando las células se transfieren del dispositivo de aféresis al dispositivo de irradiación (dispositivo que puede estar ubicado en otra habitación o laboratorio), debe cortarse la comunicación con el donante y, en consecuencia, las células se desprenden del donante. Por lo tanto, se requieren procedimientos de trazabilidad adicionales para garantizar que el producto de MNC tratado en última instancia se reinfunda en el donante correcto.

Dispositivos e inmovilización de la enzima en el dispositivo:

El sistema de FEC puede comprender un dispositivo que comprenda una matriz con moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas, tales como enzimas. La matriz con las moléculas acopladas puede exponerse a la sangre o a las MNC.

La "matriz", como se usa en el presente documento, se refiere por lo tanto a un material dentro del dispositivo de tratamiento de sangre que proporciona un material o una superficie internos a través o sobre los cuales se hace pasar sangre o plasma. La matriz, como se usa en el contexto de la presente divulgación, normalmente comprende un soporte al que se unen las moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas. El soporte sirve, por lo tanto, como portador para las moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas, aunque pueda cumplir otras funciones.

El "soporte", como se usa en el presente documento, se refiere a la porción de la matriz que sirve como "sustrato" o "material de soporte" al que están unidas las moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas. Dicho soporte o material de soporte en ocasiones también se denomina "material de adsorción" o "adsorbedor", como se usa en una "columna de adsorción" o "columna" o "cartucho de adsorción". Un soporte adecuado debe ser uniforme, hidrófilo, mecánica y químicamente estable en el intervalo de pH y temperatura pertinentes sin lixiviación o una lixiviación insignificante de la enzima durante el uso, tener buenas características de flujo para sangre completa y/o plasma sanguíneo, y proporcionar una gran superficie para la unión de enzimas.

El soporte puede ser, por ejemplo, una resina, una membrana o un material no tejido. Un material "no tejido" se refiere a un material que se define en términos generales como una estructura de lámina, tejido o banda unida entre sí mediante entrelazamiento de fibras o filamentos (y mediante películas perforadas) mecánicamente, térmicamente o químicamente, pero no tejiendo o tricotando. Una "resina" se refiere a un material insoluble que puede tomar la forma de geles o perlas de gel o perlas microporosas, o una esponja. Estas resinas pueden ser naturales o biopolímeros, polímeros sintéticos y materiales inorgánicos. La agarosa, la dextrosa y las perlas de celulosa son soportes naturales habitualmente empleados. Los soportes sintéticos poliméricos u orgánicos se basan principalmente en derivados de acrilamida, poliestireno y polimetacrilato, mientras que, la sílice porosa y el vidrio son algunos soportes inorgánicos utilizados frecuentemente.

La resina puede estar compuesta por polímeros seleccionados del grupo que consiste en alginato, quitosano, quitina, colágeno, carragenina, gelatina, celulosa, almidón, pectina y sefarsa; materiales inorgánicos seleccionados del grupo que consiste en zeolitas, materiales cerámicos, celite, sílice, vidrio, carbón activado y carbón vegetal; o polímeros sintéticos seleccionados del grupo que consiste en polietileno (PE), polioximetileno (POM), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), acetato de polivinilo (PVA), cloruro de polivinilideno (PVDC), poliestireno (PS), politetrafluoroetileno (PTFE), poliácido (PAA), metacrilato de polimetilo (PMMA), poliácido, metacrilato de poliglicidilo (PGMA), acrilonitrilo butadieno-estireno (ABS), poliácido (PAN), poliéster, policarbonato, tereftalato de polietileno (PET), poliamida, poliaramida, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), polisulfona (PS), polietersulfona (PES), poliariletersulfona (PEAS), acetato de etilvinilo (EVA), alcohol etilvinílico (EVOH), poliamidaimida, poliariletercetona (PAEK), polibutadieno (PBD), polibutileno (PB), tereftalato de polibutileno (PBT), policaprolactona (PCL), polihidroxialcanoato, poliéter éter cetona (PEEK), poliéter cetona cetona (PEEK), poliéter imida (PEI), poliimida, ácido poliláctico (PLA), polimetilpenteno (PMP), poli(p-fenilenéter) (PPE), poliuretano (PU), estireno acrilonitrilo (SAN), ácido polibutenoico, poli(ácido 4-alil-benzoico), poli(acrilato de glicidilo), metacrilato de poliglicidilo (PGMA), acrilonitrilo butadieno-estireno (ABS), polidivinilbenceno (PDVB), poli(alil glicidil éter), poli(vinil glicidil éter), poli(vinil glicidil uretano), polialilamina, polivinilamina, copolímeros de dichos polímeros y cualquiera de estos polímeros modificados mediante introducción de grupos funcionales.

Pueden usarse diversos métodos conocidos para inmovilizar las moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas al soporte y/o matriz. Dicha inmovilización puede ser específica o selectiva porque inmoviliza la enzima mientras que otras proteínas y componentes presentes en la sangre o el plasma sanguíneo o una muestra de los mismos (*in vitro*) no están inmovilizados en un grado significativo.

La "inmovilización" de una molécula inmunomoduladora u otras biomoléculas inmovilizadas al soporte para proporcionar una matriz que puede usarse en un dispositivo se refiere a una interacción covalente o no covalente que mantiene dos moléculas unidas. La expresión puede referirse a una interacción covalente, es decir, a moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas unidas covalentemente. Las interacciones no covalentes incluyen, pero sin limitación, enlace de hidrógeno, interacciones iónicas entre grupos cargados, interacciones de van der Waals e interacciones hidrófobas entre grupos no polares. Una o más de estas interacciones pueden mediar la unión de dos moléculas entre sí. De lo contrario, la unión puede ser específica, selectiva o inespecífica.

Las moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas pueden comprender marcadores de afinidad para inmovilizarlas sobre el soporte. Los marcadores de afinidad pueden usarse para purificar la proteína durante la producción y/o para inmovilizarla sobre el soporte de la matriz. Los marcadores de afinidad pueden ser secuencias polipeptídicas cortas o proteínas completas, coexpresadas como compañeros de fusión con las enzimas. Se conocen bien en la técnica diferentes tipos de marcadores de afinidad, en donde polihistidina o marcadores His₆, marcadores C-myc y marcadores FLAG están especialmente bien descritos y son opciones para unir las enzimas al material de soporte. La unión no covalente de biotina con estreptavidina o avidina también puede usarse para inmovilizar las moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas a un soporte.

Como alternativa, las moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas pueden unirse covalentemente al soporte como se detalla adicionalmente a continuación y/o como se ha descrito en la técnica anterior. El acoplamiento covalente generalmente incluye una unión covalente no dirigida al sitio de la proteína o una unión dirigida al sitio de la proteína. El soporte que forma la base para la generación de una matriz debe proporcionar o facilitar la activación química, permitiendo de este modo el acoplamiento químico de las moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas. Muchos métodos de acoplamiento para inmovilizar moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas son bien conocidos en la técnica.

Por ejemplo, la química de activación debe ser estable en un amplio intervalo de pH, condiciones de tamponamiento y temperatura dando como resultado una lixiviación insignificante de las enzimas. El método de acoplamiento debe evitar la orientación inadecuada, la unión multisitio o el impedimento estérico de las moléculas inmunomoduladoras u otras biomoléculas inmovilizadas. La densidad de enzima por volumen de matriz puede optimizarse para promover la accesibilidad y reacción de la diana.

El acoplamiento covalente puede realizarse a través de grupos funcionales comunes, incluyendo aminas, alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos y grupos epoxi. Los compuestos de carbodiimida pueden usarse para activar grupos carboxílicos de proteínas para la conjugación directa con las aminas primarias en la superficie del soporte a través

de enlaces amida. Las carbodiimidas más habitualmente utilizadas son la EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) soluble en agua para la reticulación acuosa y la DCC (N',N'-diciclohexil carbodiimida) insoluble en agua para métodos de síntesis orgánica no acuosa.

- 5 Como alternativa, los soportes pueden portar grupos funcionales específicos para acoplar un enlazador y/o enzima a los mismos. Por ejemplo, las resinas funcionalizadas están disponibles en el mercado y son conocidas por un experto en la materia. Una amplia gama de químicas de acoplamiento, que implican aminas primarias, sulfhidrilos, aldehídos, hidroxilos y ácidos carboxílicos están disponibles en dichos soportes comerciales. Son ejemplos de resinas activadas disponibles en el mercado la resina de acoplamiento CarboLink, resina epoxi Profinity™, Affi-Gel 10 y 15, Sepharose™ 6B activada con epoxi, agarosa activada con cloruro de tresilo y polímeros de metacrilato Purolite® Lifetech™ funcionalizados con grupos epoxi.

- 10 El material de soporte puede ser poroso, en donde el tamaño de poro está en el intervalo de 10 a 200 nm. Opcionalmente, el soporte toma la forma de perlas. El soporte puede comprender perlas magnéticas. Las perlas magnéticas se preparan atrapando magnetita dentro de agarosa u otro material polimérico, sobre el que se inmoviliza la enzima.

- 20 El soporte puede ser una membrana. Se han utilizado membranas como componentes de matrices de afinidad en la purificación de proteínas, debido a su simplicidad, facilidad de manipulación, área de superficie reducida y limitaciones de difusión menores en comparación con geles, resinas y perlas. Las membranas pueden tomar la forma física de una fibra hueca o, como alternativa, de una membrana de lámina plana. El soporte puede comprender un dializador de membrana de fibra hueca para hemodiálisis, en donde el filtro es un hemodializador.

- 25 Las membranas de fibra hueca o de lámina plana para su uso como soportes en un dispositivo pueden estar compuestas por celulosa, éster de celulosa (acetato de celulosa y triacetato de celulosa), poli(metacrilato de metilo)(PMMA), poliamida (PA), otros polímeros que contienen nitrógeno (polibencimidazol, poliacrilonitrilo (PAN), metacrilato de poliglicidilo (PGMA), polivinilpirrolidona (PVP), polisulfona (PS), polietersulfona (PES) o poliariletersulfona (PAES). Una membrana de fibra hueca que puede utilizarse ventajosamente para proporcionar un dispositivo puede tener un diámetro interior en el intervalo de 100 a 500 µm. Cuando el soporte de membrana es una membrana de hemodiálisis como se ha descrito anteriormente, las membranas de fibras huecas pueden funcionalizarse adicionalmente o como alternativa con una enzima en el lado del lumen de las fibras donde pueden interactuar directamente con el metabolito diana en la sangre o plasma sanguíneo que perfunde el lumen de la membrana de fibra hueca. La enzima también puede estar inmovilizada, o como alternativa, en el exterior de la membrana.

35 Métodos de tratamiento de sangre extracorpórea:

- 40 En el presente documento se describen dispositivos que están configurados para ubicarse en un circuito sanguíneo extracorpóreo a través del cual pasa la sangre de un paciente y que comprende medios para transportar sangre desde el sistema vascular del paciente a un dispositivo de tratamiento de sangre a un caudal definido y después devolver la sangre tratada de vuelta al paciente, y en donde el dispositivo está configurado además para reducir los niveles de ADMA y/o MMA en la sangre. También se describen dispositivos que pueden usarse para el tratamiento extracorpóreo de la sangre o de las células sanguíneas, en donde dichos dispositivos pueden estar separados o desprendidos o ser separables/desprendibles del circuito sanguíneo extracorpóreo.

- 45 La expresión "purificación de sangre extracorpórea" se refiere preferentemente al proceso de eliminación de sustancias de los fluidos corporales a través de su aclaramiento de la sangre que fluye en un circuito desviado fuera del cuerpo del paciente (extracorpóreo). Dichas sustancias pueden incluir toxinas endógenas (es decir, toxinas urémicas), venenos exógenos (es decir, etilenglicol o toxina fúngica), fármacos administrados, virus, bacterias, anticuerpos, metabolitos y proteínas (es decir, IMHA, miastenia grave), células anómalas (es decir, leucemia) y exceso de agua. Los procedimientos terapéuticos incluyen hemodiálisis, incluyendo hemodiálisis intermitente (HD, HDF, HF) y terapia de reemplazo renal continua (CRRT, por sus siglas en inglés); hemoperfusión; intercambio plasmático y aféresis terapéutica. Dichos métodos son conocidos por un experto y el dispositivo puede incorporarse en consecuencia.

- 50 La expresión "sangre", como se usa en el presente documento, se refiere a sangre completa que contiene todos los componentes de la sangre de un organismo, incluyendo glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas suspendidos en plasma. La expresión "plasma sanguíneo" se refiere al fluido, compuesto por aproximadamente un 92 % de agua, un 7 % de proteínas tal como albúmina, gammaglobulina, fibrinógeno, factores del complemento, factores de coagulación y un 1 % de sales minerales, azúcares, grasas, electrolitos, hormonas y vitaminas que forman parte de la sangre completa, pero que ya no contiene glóbulos rojos, blancos ni plaquetas. La expresión "plasma sanguíneo" o "plasma" se refiere a fracciones específicas del plasma sanguíneo definido anteriormente en su significado convencional, tal como, por ejemplo, suero sanguíneo.

- 65 Los caudales de sangre en un circuito de purificación de sangre extracorpóreo pueden estar entre 20 ml y 700 ml/min. Los caudales de dializado típicos en un circuito extracorpóreo que comprende un hemodializador para el

tratamiento de la insuficiencia renal, ya sea además del dispositivo de tratamiento de la sangre o en los casos en que el hemodializador además está configurado para metabolizar ADMA y/o MMA, están en el intervalo de entre 0,5 l/h y 800 ml/min.

- 5 En la aféresis terapéutica puede tratarse sangre completa o la sangre se separa en sus fracciones componentes, por ejemplo, mediante centrifugación o por medio de una membrana plasmática o un filtro, y la fracción que contiene el soluto que se eliminará, se trata específicamente antes de regresar al paciente.

- 10 Un tratamiento de aféresis en el que se elimina sangre completa o plasma (que contiene las proteínas diana) de la sangre que fluye del paciente y, después de haberla puesto en contacto con un dispositivo o matriz como se describe en el presente documento, se devuelve al paciente. Los caudales de sangre o plasma típicos en un circuito extracorpóreo en donde el dispositivo de tratamiento de sangre está perfundido con sangre completa o plasma están en el intervalo de entre 30 ml/min y 200 ml/min, o 7 ml/min y 50 ml/min, respectivamente.

- 15 El circuito sanguíneo extracorpóreo puede configurarse para realizar hemodiálisis. En este caso, el dispositivo es, por ejemplo, un hemodializador que además se ha configurado para inmovilizar una proteína diana. El circuito puede operarse en diferentes modos de tratamiento dependiendo de la necesidad médica, incluyendo el modo de hemodiálisis, hemodiafiltración y hemofiltración.

20 Acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE)

- 25 Como se usa en el presente documento, la expresión "acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario" (irAE) se refiere a cualquier efecto secundario que se produce específicamente en el contexto de un tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunitarios, por ejemplo, en el contexto de una terapia contra el cáncer. Los irAE son únicos y diferentes de los acontecimientos adversos que se producen en el contexto de las terapias tradicionales contra el cáncer y, normalmente, tienen un inicio retardado y una duración prolongada. Los irAE pueden afectar a cualquier órgano o sistema. Estos efectos frecuentemente son de bajo grado y son tratables y reversibles; sin embargo, algunos efectos adversos pueden ser graves y provocar trastornos permanentes. El tratamiento se basa principalmente en corticosteroides y otros agentes inmunomoduladores, que debe prescribirse con cuidado para reducir el potencial de complicaciones a corto y largo plazo.

- 35 En particular, la expresión comprende síntomas de una enfermedad autoinmunitaria y enfermedades autoinmunitarias, tales como colitis (autoinmunitaria), hepatitis (autoinmunitaria), tiroiditis (autoinmunitaria) y dermatitis (autoinmunitaria).

- 40 El irAE debido a la administración de una terapia con inhibidores de puntos de control en el método de la presente invención comprende colitis autoinmunitaria. Un irAE debe entenderse como un acontecimiento adverso que se presume que está relacionado con el sistema inmunitario: irAE (véase, por ejemplo, Formulario de entrevista de fármacos de OPDIVO® Infusión intravenosa 20 mg-100 mg, revisado en abril de 2016 (versión 9); Propiedades y manejo de acontecimientos adversos de un anticuerpo anti-CTLA-4, Ipilimumab (YERVOY®), de fecha 24 de agosto de 2015, emitido por el Comité de Seguridad de Nuevos Fármacos para el Melanoma Maligno de la Asociación Dermatológica Japonesa).

- 45 Los irAE incluyen enfermedad pulmonar intersticial, miastenia grave, miositis, colitis, diabetes mellitus de tipo 1, disfunción hepática (trastorno hepático), trastorno pulmonar tal como hepatitis (por ejemplo, neumonía autoinmunitaria), pituitarismo tal como hipopituitarismo o hipofisitis, disfunción tiroidea tal como hipotiroidismo, neuropatía, nefropatía, encefalitis, trastorno suprarrenal tal como insuficiencia suprarrenal, trastorno grave de la piel, tromboembolia venosa, reacción a la infusión, psoriasis, erupción psoriasiforme, diarrea (por ejemplo, diarrea grave), artritis reumatoide, uveítis, epiescleritis, bursitis, exacerbación de la radiodermatitis, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (en lo sucesivo en el presente documento también denominada polineuropatía desmielinizante), trastorno del tracto biliar o nefritis y pituitarismo.

- 55 Se sabe que ha ocurrido un acontecimiento adverso relacionado con el sistema inmunitario (irAE), por ejemplo, después de 8 semanas o de 8 a 12 semanas después de la administración. El acontecimiento adverso relacionado con el sistema inmunitario puede evaluarse mediante "grado" o "evaluación de irAE". En este caso, la "evaluación de irAE" es un índice que representa la gravedad de una enfermedad, y está representado por 1 a 3. En la evaluación de irAE, 1 representa una afección que "no requiere intervención terapéutica adicional debido a irAE", 2 representa una afección que "requiere intervención farmacológica, etc., debido al irAE, pero que no requiere tratamiento de hospitalización o no requiere interrupción del tratamiento", y 3 representa una afección que "requiere intervención farmacológica, etc., acompañada de hospitalización debida al irAE y requiere interrupción del tratamiento". La correspondencia entre "evaluación de irAE" y "grado" varía dependiendo de cada enfermedad.

Moléculas de puntos de control inmunitarios y moduladores de puntos de control

- 65 Un inhibidor de puntos de control inmunitarios es un fármaco que activa las células inmunitarias mediante la modulación de moléculas de puntos de control inmunitarios.

Las moléculas de puntos de control inmunitarios son moléculas en el sistema inmunitario que activan una señal (moléculas coestimuladoras) o inactivan una señal proporcionada a las células efectoras inmunitarias. Por lo tanto, las moléculas de puntos de control inmunitarios pueden subdividirse en moléculas de puntos de control coestimuladoras o moléculas de puntos de control coinhibidoras. Las moléculas de puntos de control coestimuladoras incluyen receptores de linfocitos coestimuladores, que son receptores de superficie de linfocitos que pueden conducir a una activación o estimulación de las funciones efectoras de linfocitos. Las moléculas de puntos de control coinhibidoras incluyen receptores de linfocitos coinhibidores, que son receptores de superficie de linfocitos que pueden conducir a una inhibición de las funciones efectoras de linfocitos.

Las moléculas de puntos de control coestimuladoras comprenden, sin limitación, HVEM, CD27, CD40, OX40, GITR, CD137, CD28 y ICOS.

Opcionalmente, la expresión receptor de linfocitos coestimulador no se refiere a CD122.

HVEM (mediador de entrada de herpesvirus, CD270) también se conoce como miembro 14 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF14) y es un receptor de la superfamilia de receptores de TNF, que puede unirse a BTLA.

CD27 respalda la expansión específica de antígeno de los linfocitos T sin activación previa y es vital para la generación de memoria de linfocitos T y también es un marcador de memoria de los linfocitos B. La actividad de CD27 se rige por la disponibilidad transitoria de su ligando, CD70, sobre linfocitos y células dendríticas. Se sabe que la coestimulación de CD27 suprime la función de los linfocitos Th17 efectoras. Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal agonista CDX-1127/Varlilumab contra CD27 es eficaz en el contexto de la estimulación de receptores de linfocitos T en modelos animales.

CD28 se expresa constitutivamente en casi todos los linfocitos T CD4⁺ humanos y en aproximadamente la mitad de todos los linfocitos T CD8. La unión de uno de sus dos ligandos CD80 y CD86, expresados, por ejemplo, en células dendríticas, provoca la expansión de linfocitos T.

CD40 se expresa en una diversidad de células del sistema inmunitario, incluyendo las células presentadoras de antígenos. El ligando de CD40 se llama CD40L, también conocido como CD154, y se expresa transitoriamente en la superficie de los linfocitos T CD4⁺ activados, como su ligando. Se sabe que la señalización de CD40 "autoriza" a las células dendríticas a madurar y, por lo tanto, desencadena la activación y diferenciación de los linfocitos T.

4-1BB (CD137) se une al ligando de CD137, dando como resultado la proliferación de linfocitos T. También se sabe que la señalización mediada por CD137 protege los linfocitos T y, en particular, los linfocitos T CD8⁺ de la muerte celular inducida por activación. El anticuerpo monoclonal agonista de IgG2 totalmente humano, Utomilumab (PF-05082566), se dirige a 4-1 BB para estimular un ataque más intenso del sistema inmunitario contra los cánceres.

OX40 (CD134) tiene OX40L (CD252) como ligando. OX40 promueve la expansión de los linfocitos T efectoras y de memoria y también es conocido por su capacidad para suprimir la diferenciación y actividad de los linfocitos T reguladores. OX40 se expresa transitoriamente después del acoplamiento de receptores de linfocitos T, razón por la cual sólo está regulado positivamente en los linfocitos T activados por antígenos más recientemente dentro de las lesiones inflamatorias, razón por la cual el OX40 es una diana farmacológica valiosa. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales anti-OX40 agonistas tienen utilidad clínica en el cáncer avanzado. La empresa farmacéutica AstraZeneca tiene tres fármacos en desarrollo dirigidos a OX40: MEDI0562 es un agonista de OX40 humanizado; MEDI6469, agonista de OX40 murino; y MEDI6383, un agonista de OX40.

GITR (gen relacionado con la familia de TNFR inducidos por glucocorticoides) provoca la expansión de linfocitos T. El ligando para GITR (GITRL) se expresa principalmente en células presentadoras de antígenos. Se ha demostrado que los anticuerpos contra GITR promueven una respuesta antitumoral a través de la pérdida de la estabilidad del linaje de Treg.

ICOS (coestimulador inducible de linfocitos T, también denominado CD278) se expresa en linfocitos T activados. Su ligando es ICOSL, expresado principalmente en linfocitos B y células dendríticas. La molécula parece ser importante en la función efectora de los linfocitos T.

Las moléculas de puntos de control coinhibidoras comprenden, sin limitación, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, TIM-3, TIGIT y VISTA.

A2AR (receptor de adenosina A2A) se considera un punto de control importante en la terapia contra el cáncer porque la adenosina en el microambiente inmunitario, que conduce a la activación del receptor A2a, es un circuito de retroalimentación inmunitaria negativa y el microambiente tumoral tiene concentraciones relativamente altas de adenosina.

B7-H3, también denominado CD276, se entendió originariamente que era una molécula coestimuladora, pero ahora se considera coinhibidora. MacroGenics está trabajando en MGA271 (Enoblituzumab), que es un anticuerpo monoclonal de Fc optimizado que se dirige a B7-H3.

- 5 B7-H4 (o VTCN1) se expresa en células tumorales y macrófagos asociados a tumores y desempeña una función en la evasión de tumores.

10 BTLA (Atenuador de linfocitos B y T, también denominado CD272) es un receptor coinhibidor, que tiene a HVEM (mediador de entrada de herpesvirus) como ligando. La expresión superficial de BTLA se regula negativamente de forma gradual durante la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ humanos del fenotipo de linfocitos sin activación previa a efectores, sin embargo, los linfocitos T CD8⁺ humanos específicos de tumores expresan niveles altos de BTLA.

15 CTLA-4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos, también denominada CD152) se expresa en linfocitos Treg y sirve para controlar la proliferación de linfocitos T. CTLA-4 (CD152) es un receptor de proteína que actúa como punto de control inmunitario y es expresado por linfocitos T activados y transmite una señal inhibidora a los linfocitos T. CTLA4 es homólogo a la proteína coestimuladora de linfocitos T CD28, y ambas moléculas se unen a CD80 y CD86 (B7-1 y B7-2, respectivamente), en las células presentadoras de antígenos. CTLA-4 tiene una mayor afinidad y avidez por CD80 y CD86 que por CD28. CTLA4 transmite una señal inhibidora a los linfocitos T. Los anticuerpos antagonistas dirigidos contra CTLA4 incluyen ipilimumab y tremelimumab.

25 IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa) es una enzima catabólica de triptófano con propiedades inmunoinhibidoras. Otra molécula importante es TDO, triptófano 2,3-dioxigenasa. Se sabe que IDO suprime los linfocitos T y NK, genera y activa Treg y células supresoras derivadas de mieloides, y promueve la angiogénesis tumoral.

KIR (receptor similar a inmunoglobulina de linfocitos citolíticos) es un receptor para moléculas de MHC de clase I en linfocitos citolíticos naturales. Lirilumab es un anticuerpo monoclonal contra KIR.

30 LAG-3 (Gen de activación de linfocitos 3) actúa para suprimir una respuesta inmunitaria mediante la acción de los Treg, así como efectos directos sobre los linfocitos T CD8⁺.

35 PD-1 (Muerte Programada 1, o CD279) es un receptor de la superficie celular que desempeña una función importante en la regulación negativa del sistema inmunitario y la promoción de la autotolerancia mediante la supresión de la actividad inflamatoria de los linfocitos T. PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. Una ventaja del direccionamiento a PD-1 es que puede restablecer la función inmunitaria en el microambiente tumoral. PD-L1, el ligando de PD1, se expresa altamente en varios cánceres y puede conducir a la inhibición de la respuesta inmunitaria contra el cáncer por parte de los linfocitos T. Se han desarrollado varios agentes inmunoterápicos contra el cáncer dirigidos que se dirigen al receptor PD-1, incluyendo los anticuerpos antagonistas nivolumab, (Opdivo - Bristol Myers Squibb), Pembrolizumab (Keytruda, MK-3475, Merck), Pidilizumab (CT-011, Cure Tech) y BMS-936559 (Bristol Myers Squibb). Tanto atezolizumab (MPDL3280A, Roche) como Avelumab (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania y Pfizer) son anticuerpos monoclonales dirigidos contra PD-L1, el ligando de PD-1.

45 TIM-3 (dominio de inmunoglobulina de linfocitos T y dominio 3 de Mucina) se expresa en linfocitos T CD4⁺ humanos activados y regula las citocinas Th1 y Th17. TIM-3 actúa como un regulador negativo de la función de Th1/Th17 desencadenando la muerte celular tras la interacción con su ligando, galectina-9.

50 VISTA (supresor de Ig de dominio V de la activación de linfocitos T) es una proteína que se expresa principalmente en células hematopoyéticas, de manera que la expresión constante de VISTA en leucocitos dentro de los tumores puede permitir que el bloqueo de VISTA sea eficaz en una amplia gama de tumores sólidos.

TIGIT (inmunorreceptor de linfocitos T con dominios de Ig e ITIM, también denominado WUCAM y Vstm3) es un receptor inmunitario presente en algunos linfocitos T y linfocitos citolíticos naturales y regula la inmunidad mediada por linfocitos T. TIGIT podría unirse a CD155 en CD y macrófagos con alta afinidad y a CD112 con menor afinidad.

55 Los receptores de linfocitos coinhibidores comprenden PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, BTLA o VISTA. Los receptores de linfocitos coestimuladores comprenden OX40, 4-1BB, GITR, CD27, HVEM, CD28 o CD40.

60 Un inhibidor de un receptor impide la generación de una señal por parte del receptor respectivo. En consecuencia, un inhibidor de un receptor de linfocitos coinhibidor es una molécula que impide la activación del receptor respectivo y, por lo tanto, impide la generación de una señal inhibidora. Por el contrario, un activador de un receptor induce la generación de una señal por parte del receptor respectivo y un activador de un receptor de linfocitos coestimulador conduce a la generación de una señal estimuladora.

65 Los moduladores de puntos de control son moléculas que interfieren con la actividad de las moléculas de puntos de control inmunitarios, ya sea estimulando o inhibiendo la actividad de las moléculas de puntos de control inmunitarios.

Los moduladores de puntos de control solubles son moléculas que pueden ser capaces de difundir libremente y, por ejemplo, no están unidos a una membrana celular o no permanecen intracelulares.

Los inhibidores de puntos de control como se describen en el presente documento comprenden moduladores de puntos de control estimuladores de linfocitos, que son moléculas que conducen a una activación de los linfocitos, preferentemente linfocitos T efectores, ya sea a través de la activación de una molécula de punto de control coestimuladora o mediante la inhibición de una molécula de punto de control coinhibidora. Además, los moduladores de puntos de control estimuladores de linfocitos solubles incluyen moléculas que interfieren con la activación de moléculas de puntos de control inmunitarios unidas a la membrana, tal como una forma soluble de la respectiva molécula de punto de control inmunitario.

Los moduladores de puntos de control pueden ser moléculas de origen natural o moléculas modificadas por ingeniería genética con la función respectiva que interfiere con o modula la actividad de una molécula de punto de control inmunitario. Los moduladores de puntos de control incluyen, por ejemplo, la actividad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos dirigida contra moléculas de puntos de control inmunitarios con agonistas o antagonistas, y ligandos o ligandos modificados de moléculas de puntos de control inmunitarios.

Células inmunitarias:

Las células inmunitarias, como se describen en el presente documento, se refieren a células biológicas implicadas en la respuesta inmunitaria en un sujeto. Las células inmunitarias se seleccionan preferentemente de linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, granulocitos, células linfoides innatas (ILC, por sus siglas en inglés), megacariocitos (por sus siglas en inglés), monocitos/macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés), plaquetas, glóbulos rojos (GR) y/o timocitos.

La expresión "células inmunitarias" comprende las MNC que se encuentran en la sangre, que también pueden denominarse células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés). Las PBMC comprenden cualquier célula de la sangre periférica que tenga un núcleo redondo y consisten principalmente en linfocitos (linfocitos T, células B, linfocitos NK) y monocitos, mientras que los eritrocitos y las plaquetas no tienen núcleo, y los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) tienen núcleos multilobulados. En seres humanos, los linfocitos constituyen la mayor parte de la población de PBMC, seguidos de monocitos y sólo un pequeño porcentaje de células dendríticas. Estas células pueden extraerse de la sangre completa usando ficoll, un polisacárido hidrófilo que separa capas de sangre, y centrifugación en gradiente, que separará la sangre en una capa superior de plasma, seguida de una capa de PBMC y una fracción inferior de células polimorfonucleares (tales como neutrófilos y eosinófilos) y eritrocitos. Las células polimorfonucleares pueden aislarse adicionalmente lisando los glóbulos rojos. En ocasiones se encuentran basófilos tanto en la fracción más densa como en la de PBMC.

Los linfocitos T o células T son un tipo de linfocito (un subtipo de glóbulo blanco) que desempeña una función central en la inmunidad mediada por células. Se pueden distinguir de otros linfocitos, tales como linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales, por la presencia de un receptor de linfocitos T en la superficie celular. Cada uno de los diversos subconjuntos de linfocitos T tiene una función distinta. Los subtipos de linfocitos T incluyen, sin limitación, linfocitos T auxiliares de tipo 1 (Th1), linfocitos T auxiliares de tipo 2 (Th2), linfocitos T auxiliares de tipo 9 (Th9), linfocitos T auxiliares de tipo 17 (Th17), linfocitos T auxiliares de tipo 22 (Th22), linfocitos T auxiliares foliculares (Tfh), linfocitos T reguladores (Treg), linfocitos T citolíticos naturales (NKT), linfocitos T gamma delta, linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL). Otras realizaciones no limitantes de linfocitos T incluyen timocitos, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo, linfocitos citolíticos inducidos por citocinas (linfocitos CIK) o linfocitos T activados. Los linfocitos citolíticos inducidos por citocinas (CIK) normalmente son linfocitos T similares a citolíticos naturales (NK) positivos para CD3 y CD56, y no restringidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El linfocito T puede ser un linfocito T CD4+, un linfocito T citotóxico (CTL; linfocito T CD8+), linfocito T CD4+CD8+, linfocito T CD4 CD8, o cualquier otro subconjunto de linfocitos T.

La presente invención en particular se refiere a un método para obtener linfocitos NK inmunorreguladores (que también pueden denominarse linfocitos NK inmunomoduladores) que pueden usarse en el tratamiento y/o la prevención de acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) en un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control, preferentemente como terapia celular.

Los linfocitos NK inmunomoduladores son una forma específica de células linfoides innatas (ILC). Las ILC son un grupo de células inmunitarias innatas que pertenecen al linaje linfoide (linfocitos), pero que no responden de una manera específica de antígeno, ya que carecen de un receptor de linfocitos B o T. Este grupo de células descrito relativamente recientemente tiene diferentes funciones fisiológicas, algunas de ellas análogas a las de los linfocitos T auxiliares, incluyendo al mismo tiempo las de los linfocitos NK citotóxicos. Por consiguiente, tienen una función importante en la inmunidad protectora y la regulación de la homeostasis y la inflamación. Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son células efectoras innatas citotóxicas análogas a los linfocitos T citotóxicos del sistema inmunitario adaptativo. Se distribuyen por toda la sangre, órganos y tejido linfoide y constituyen aproximadamente el 15 % de los linfocitos de la sangre periférica. Los linfocitos NK desempeñan una función en la vigilancia de tumores y en la eliminación rápida de células infectadas por virus. No requieren la señal "propia" faltante del MHC de Clase I y

pueden reconocer células tensionadas en ausencia de anticuerpos, permitiéndoles reaccionar mucho más rápidamente que el sistema inmunitario adaptativo. Los linfocitos citolíticos naturales (NK) desempeñan funciones fundamentales en la inmunidad del hospedador contra el cáncer. En respuesta, los cánceres desarrollan mecanismos para escapar del ataque de los linfocitos NK o inducir linfocitos NK defectuosos (Cheng M *et al. Cell Mol Immunol.* Mayo de 2013; 10(3):230-52. doi: 10.1038/cmi.2013.10. Epub de 22 de abril de 2013).

Los linfocitos NK inmunorreguladores obtenidos mediante los métodos de la invención se caracterizan preferentemente por una expresión baja (o expresión regulada negativamente) de CD16, en particular en linfocitos NK CD56^{oscuro}. CD16 es el FcγRIII, un receptor de linfocitos NK activador que puede inducir una fuerte producción de citocinas. La eliminación/regulación negativa de CD16 puede ser un mecanismo inmunorregulador de los linfocitos NK para evitar la autoinmunidad. La regulación negativa de CD16 modula las respuestas de los linfocitos NK y contribuye al mantenimiento de la homeostasis inmunitaria de las vías dependientes de anticuerpos y linfocitos T. Además, los linfocitos NK inmunorreguladores obtenidos mediante métodos de la invención pueden mostrar una expresión baja de GM-CSF, IFN-γ, TNF y/o IL-2.

La generación o inducción de linfocitos NK inmunorreguladores en una muestra puede medirse comparando el fenotipo de los linfocitos NK y la distribución de la población de linfocitos NK en una muestra antes y después de realizar el método de la invención, por ejemplo, mediante análisis por citometría de flujo, expresión génica y/o espectrometría de masas de la abundancia de proteínas. Por ejemplo, un cambio de linfocitos NK de CD16-alto a CD16-bajo después de irradiación es indicativo de la inducción de un fenotipo inmunorregulador. Además, una disminución en la cantidad de la expresión de GM-CSF, IFN-γ, TNF y/o IL-2 en la población de linfocitos NK también indicaría la inducción de linfocitos NK inmunorreguladores. Un experto conoce métodos y protocolos adecuados de identificación de diferentes poblaciones de linfocitos NK dentro de una muestra. Por ejemplo, en una muestra derivada de sangre, la población total de linfocitos NK puede definirse e identificarse, preferentemente mediante citometría de flujo, como la población de células positivas para CD45, negativas para CD14, negativas para CD3, negativas para CD19 negativas y positivas para CD56. Dentro de esta población, puede realizarse una identificación y una cuantificación adicionales de los linfocitos NK inmunorreguladores, por ejemplo determinando la expresión de CD16, GM-CSF, IFN-γ, TNF y/o IL-2. Los linfocitos NK inmunorreguladores son preferentemente positivos para CD56, pero muestran un nivel de expresión comparativamente bajo de CD56 (expresión "oscura").

Otras características y definiciones de linfocitos NK inmunorreguladores están bien establecidas en la técnica y son objeto de múltiples artículos de investigación y revisión que son conocidos o pueden ser identificados por un experto.

La expresión "funciones inmunomoduladoras" se refiere a funciones o propiedades de moléculas o células que inducen un cambio o modulación en la función, acción o estado de cualquier componente del sistema inmunitario.

Las terapias celulares normalmente implican la administración de células inmunitarias aisladas de la sangre del paciente. Los tipos de células que pueden usarse de esta manera son, sin limitación, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos citolíticos activados por linfocinas, linfocitos T citotóxicos, monocitos, macrófagos, granulocitos y células dendríticas. La terapia con células dendríticas provoca respuestas antitumorales al hacer que las células dendríticas presenten antígenos tumorales. Las células dendríticas presentan antígenos a los linfocitos, lo que los activa, preparándolos para destruir otras células que presentan el antígeno.

Aplicación terapéutica

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" significa un ser humano o un animal no humano seleccionado para el tratamiento o la terapia. El sujeto o paciente, tal como el sujeto que necesita tratamiento o prevención, puede ser un animal, un animal vertebrado, un mamífero, un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), un murino (por ejemplo, un ratón), un canino (por ejemplo, un perro), un felino (por ejemplo, un gato), un equino (por ejemplo, un caballo), un primate, un simio (por ejemplo, un mono o un simio), un mono (por ejemplo, un tití, un babuino), un simio (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibbon) o un ser humano. El significado de los términos "animal", "mamífero", etc. es bien conocido en la técnica y puede deducirse, por ejemplo, de Wehner y Gehring (1995; Thieme Verlag). Se prevé, en particular, que se han de tratar animales de importancia económica, agronómica o científica. Opcionalmente, el sujeto/paciente es un mamífero. Normalmente, el sujeto/paciente es un ser humano.

El sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control puede padecer cáncer, tal como un melanoma maligno u otro cáncer tratable mediante terapia con inhibidores de puntos de control.

El término "cáncer" se refiere al tratamiento de todo tipo de cáncer, independientemente de si el cáncer está asociado a la formación de un tumor sólido o si las células cancerosas no forman un tumor sólido, como es el caso de determinadas leucemias.

El cáncer comprende un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo y está provocado por una proliferación y un crecimiento celulares anómalos. Estas células en proliferación tienen el potencial de invadir el tejido circundante y/o extenderse a otras partes del cuerpo donde forman metástasis. A nivel mundial, en

2012 se produjeron 14 millones de nuevos casos de cáncer y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer (*World Cancer Report 2014*). La mayoría de los cánceres son provocados por señales ambientales relacionadas con el consumo de tabaco, la obesidad e infecciones entre otros, mientras que aproximadamente el 5-10 % son casos genéticos. Los cánceres pueden clasificarse en subcategorías basándose en la célula de origen. Las subcategorías más comunes son los carcinomas de células epiteliales, sarcomas de tejido conectivo y linfomas y leucemias de células hematopoyéticas. El cáncer se asocia a una gran diversidad de síntomas locales y sistémicos y en muchos casos no se puede curar. A la luz del elevado número de nuevos pacientes con cáncer y de muertes relacionadas con el cáncer, se requieren estrategias de tratamiento novedosas.

10 Cáncer se refiere a todo tipo de cáncer o neoplasia o tumores malignos que se encuentran en mamíferos, incluyendo leucemias, sarcomas, melanomas y carcinomas. Pueden tratarse tumores sólidos y/o líquidos (tales como leucemia o linfoma).

15 Los melanomas incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, melanoma lentiginoso acral, melanoma amelanótico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, melanoma maligno lentigo, melanoma maligno, melanoma nodular, melanoma subungueal y melanoma de extensión superficial.

20 Las leucemias incluyen, pero sin limitación, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de linfocitos T en adultos, leucemia aleucémica, una leucemia leucocitémica, leucemia basófila, leucemia de células blásticas, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutánea, leucemia embrionaria, leucemia eosinófila, leucemia de Gross, leucemia de tricoleucocitos, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmocítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica y leucemia de células indiferenciadas.

35 Los sarcomas incluyen, pero sin limitación, un condrosarcoma, fibrosarcoma, linfoma, melanoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma de la parte blanda alveolar, sarcoma ameloblástico, sarcoma botriode, sarcoma cloroma, coriocarcinoma, sarcoma embrionario, sarcoma tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma estromático, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado múltiple idiopático, sarcoma inmunoblástico de linfocitos B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de linfocitos T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma mesenquimoma maligno, sarcoma perióstico, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma seroquístico, sarcoma sinovial y sarcoma telangiectásico.

45 Los carcinomas incluyen, pero sin limitación, carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenoquístico, carcinoma adenoide quístico, carcinoma adenomatoso, carcinoma de corteza suprarrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma basoelular, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoesquamosas, carcinoma broncoalveolar, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriiforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinomas coloide, comedo carcinoma, carcinoma de cuerpo, carcinoma cribiforme, carcinoma en armadura, carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma de conductos, carcinoma duro, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epiermoide, carcinoma epitelial adenoide, carcinoma exofítico, carcinoma exulcero, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma gigantocelular, carcinoma glandular, carcinoma de células de la granulosa, carcinoma de la matriz capilar, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Hurthle, carcinoma hialino, carcinoma hipernefroide, carcinoma embrionario infantil, carcinoma *in situ*, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células de Kulchitzky, carcinoma macrocítico, carcinoma lenticular, carcinoma lenticular, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfoepitelial, carcinoma medular, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma blando, carcinoma mucinoso, carcinoma coloide, carcinoma mucocelular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma mucoide, carcinoma mucoso, carcinoma mixomatoide, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células de avena, carcinoma osificante, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinoma preinvasivo, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultáceo, carcinoma de células renales de riñón, carcinoma de células de reserva, carcinoma sarcomatoide, carcinoma schneideriano, carcinoma escirro, carcinoma de escroto, carcinoma de células de anillo, carcinoma simple, carcinoma microcítico, carcinoma solanoide, carcinoma de células esferoideas, carcinoma de células fusiformes, carcinoma esponjoso, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma de hilo, carcinoma telangiectásico, carcinoma telangiectoide, carcinoma de células transicionales, carcinoma tuberoide, carcinoma tuberoso, carcinoma verrugoso y carcinoma veloso.

65 Los cánceres adicionales incluyen, pero sin limitación, la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin, mieloma

múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomyosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón microcíticos, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulanoma pancreático maligno, carcinóide maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, cáncer esofágico, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer de cuello de útero, cáncer de endometrio, cáncer de corteza suprarrenal y cáncer de próstata.

El término "tumor" puede incluir, sin limitación, un tumor de próstata, un tumor pancreático, un carcinoma de células escamosas, un tumor de mama, un melanoma, un carcinoma de células basales, un carcinoma hepatocelular, un carcinoma colangiocelular, cáncer testicular, un neuroblastoma, un glioma o un tumor astrocítico maligno tal como glioblastoma multiforme, un tumor colorrectal, un carcinoma de endometrio, un carcinoma de pulmón, un tumor de ovario, un tumor cervical, un osteosarcoma, un rabdo/leiomyosarcoma, un sarcoma sinovial, el angiosarcoma, un sarcoma de Ewing/PNET y un linfoma maligno. Estos incluyen tumores primarios y tumores metastásicos (tanto vascularizados como no vascularizados).

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "terapia" generalmente significa obtener un efecto farmacológico y/o efecto fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico con vistas a prevenir total o parcialmente una enfermedad y/o un síntoma, por ejemplo, reduciendo el riesgo de que un sujeto tenga una enfermedad o síntoma particular, o puede ser terapéutico con vistas a curar parcial o totalmente una enfermedad y/o un efecto adverso de la enfermedad. El término "terapia" incluye tratamientos arbitrarios de enfermedades o afecciones en mamíferos, en particular, seres humanos, por ejemplo, los siguientes tratamientos (a) a (c): (a) Prevención de la aparición de una enfermedad, afección o síntoma en un paciente; (b) Inhibición de un síntoma de una afección, es decir, prevención de la progresión del síntoma; (c) Mejora de un síntoma de una afección, es decir, inducción de la regresión de la enfermedad o síntoma.

Como se usa en el presente documento, el término "administrar" significa proporcionar células o un líquido que las contiene o una composición a un sujeto, e incluye, pero sin limitación, la administración por un profesional médico y la autoadministración. La administración de una composición, sustancia, un compuesto o un agente a un sujeto puede realizarse usando uno de una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede administrarse un compuesto o un agente, por vía intravenosa, por vía arterial, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía ocular, por vía sublingual, por vía oral (mediante ingestión), por vía intranasal (mediante inhalación), por vía intraespinal, por vía intracerebral y por vía transdérmica (mediante absorción, por ejemplo, a través de un conducto cutáneo). También puede introducirse de manera apropiada un compuesto o agente mediante dispositivos recargables o biodegradables u otros dispositivos, por ejemplo, parches y bombas o formulaciones, que proporcionan la liberación prolongada, lenta o controlada del compuesto o agente. La administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

El tratamiento de un paciente mediante la introducción de un número terapéuticamente eficaz de células, en particular linfocitos NK inmunomoduladores obtenidos mediante el método de la invención, en el torrente sanguíneo de un sujeto, se describe en el presente documento pero no forma parte de la invención reivindicada. Como se usa en el presente documento, "introducir" células "en el torrente sanguíneo del sujeto" incluye, sin limitación, introducir dichas células en una de las venas o arterias del sujeto a través de inyección. Dicha administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados. Es adecuada una única inyección, pero en algunos casos pueden ser necesarias inyecciones repetidas a lo largo del tiempo (por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cuatrimestralmente, semestralmente o anualmente). Dicha administración también puede realizarse usando una mezcla de células negativas para CD34 y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, tampón de fosfato 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05 M o solución salina al 0,8 %, así como medios de crioconservación patentados de uso común. La administración también puede producirse por vía local, por ejemplo, mediante inyección en un área del cuerpo del sujeto próxima al órgano o tejido sintomático.

Adicionalmente, dichos portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones, mucho más normalmente soluciones acuosas. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones y suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer y aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluido y nutrientes, reponedores de electrolitos tales como dextrosa de Ringer, aquellos basados en dextrosa de Ringer y similares. Los fluidos que se usan habitualmente para la administración i.v. se encuentran, por ejemplo, en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20.^a Ed., pág. 808, Lippincott Williams S- Wilkins (2000). También puede haber presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

Puede administrarse un número terapéuticamente eficaz de células. Esto puede referirse a los linfocitos NK obtenidos mediante el método de la invención o a una célula inmunitaria terapéutica como terapia inmunitaria combinada. Como se usa en el presente documento, un "número de células terapéuticamente eficaz" incluye, sin

limitación, las siguientes cantidades e intervalos de cantidades: (i) de aproximadamente 1×10^2 a aproximadamente 1×10^8 células/kg de peso corporal; (ii) de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^7 células/kg de peso corporal; (iii) de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^6 células/kg de peso corporal; (iv) de aproximadamente 1×10^4 a aproximadamente 1×10^5 células/kg de peso corporal; (v) de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^6 células/kg de peso corporal; (vi) de aproximadamente 5×10^4 a aproximadamente $0,5 \times 10^5$ células/kg de peso corporal; (vii) aproximadamente 1×10^3 células/kg de peso corporal; (viii) aproximadamente 1×10^4 células/kg de peso corporal; (ix) aproximadamente 5×10^4 células/kg de peso corporal; (x) aproximadamente 1×10^5 células/kg de peso corporal; (xi) aproximadamente 5×10^5 células/kg de peso corporal; (xii) aproximadamente 1×10^6 células/kg de peso corporal; y (xiii) aproximadamente 1×10^7 células/kg de peso corporal. Los pesos corporales humanos previstos incluyen, sin limitación, aproximadamente 5 kg, 10 kg, 15 kg, 30 kg, 50 kg, aproximadamente 60 kg; aproximadamente 70 kg; aproximadamente 80 kg, aproximadamente 90 kg; aproximadamente 100 kg, aproximadamente 120 kg y aproximadamente 150 kg. Estas cifras se basan en experimentos preclínicos con animales y ensayos en seres humanos y protocolos convencionales del trasplante de células madre hematopoyéticas CD34+. Las células mononucleares (incluyendo las células CD34+) por lo general contienen entre 1:23.000 y 1:300.000 células negativas para CD34. Estos números de células pueden aplicarse a linfocitos NK obtenidos mediante el método de la invención.

La presente divulgación también incluye kits, envases y unidades de recipientes múltiples y otros materiales de los sistemas de FEC descritos en el presente documento y componentes de los mismos y material para realizar el método *in vitro*, así como para preparar y aislar los linfocitos NK obtenidos mediante el método de la invención.

FIGURAS

La invención se describe adicionalmente en las siguientes figuras.

Descripción de las figuras

Figura 1: Colitis autoinmunitaria refractaria que responde a la FEC y que conduce a la expansión de los linfocitos NK inmunorreguladores.

- (a) Se muestra la gravedad de la diarrea del paciente de acuerdo con criterios de toxicidad comunes (eje y) a lo largo del tiempo (eje x) con diferentes tratamientos.
- (b) Imagen de colonoscopia (panel izquierdo) y sección de biopsia teñida con HyE (panel derecho) del diagnóstico inicial de colitis relacionada con inhibidores de puntos de control inmunitarios que muestra edema y ulceraciones de la mucosa.
- (c) Imagen de colonoscopia (panel izquierdo) y sección de biopsia teñida con HyE (panel derecho) después de un tratamiento exitoso con FEC que no muestra signos de colitis autoinmunitaria. Las criptas colónicas muestran una morfología regular sin infiltraciones granulocíticas, apoptosis o pérdida de criptas.
- (d) Gráfico de tSNE que visualiza el compartimento de linfocitos periféricos del paciente antes y 8 semanas después de iniciar la FEC.
- (e) Números relativos de linfocitos NK antes y después del tratamiento con FEC.
- (f) Intensidad de expresión de CD16, CD56 y CD57 en linfocitos NK (definidos como únicos/vivos/CD45^{pos}/CD14^{neg}/CD3^{neg}/CD19^{neg}/CD56^{pos}) de donantes sanos, de la misma edad (HD donantes sanos, por sus siglas en inglés, n = 5) y el paciente en la semana 53 y la semana 75 después del inicio de la FEC visualizado por UMAP. Los subconjuntos de linfocitos NK agrupados por FlowSOM están superpuestos en los dos gráficos de la derecha.
- (g) IFM (mediana de la expresión del marcador, intervalo de valores: 0-1) de CD16 en linfocitos NK maduros CD56^{oscuro}. HD (n = 5), los bigotes del diagrama de caja representan los valores mínimo y máximo del conjunto de datos de HD.
- (h) Supervivencia de ratones inyectados con linfocitos T (Te) con o sin linfocitos NK (dosis de NK de 4×10^4 o 4×10^5 por ratón) en un modelo de irAE inducido por anticuerpos anti-PD1 como se describe en Supl. Apéndice. ** p = 0,003, **** p < 0,0001.

Figura 2:

- (a) Gráfico de tSNE que muestra 1000 linfocitos CD45⁺ seleccionados estocásticamente (linfocitos definidos por FSC/SSC) de cada punto temporal con su expresión de los marcadores indicados.
- (b) Mapa térmico que muestra la mediana de la expresión del marcador (intervalo de valores: 0-1) para cada población anotada.
- (c) Recuentos absolutos de linfocitos NK antes y después del tratamiento con FEC.
- (d) Números relativos de linfocitos B, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T CD4⁻ CD8⁻ antes y después del tratamiento con FEC.
- (e) Recuentos absolutos de linfocitos B, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T CD4⁻ CD8⁻ antes y después del tratamiento con FEC.
- (f) Intensidad de expresión de los marcadores indicados en linfocitos NK (definidos como únicos/vivos/CD45^{pos}/CD14^{neg}/CD3^{neg}/CD19^{neg}/CD56^{pos}) de HD (n = 5) y el paciente en la semana 53 y semana

75 visualizado por UMAP.

(g) Mapa térmico que muestra la mediana de la expresión del marcador (intervalo de valores: 0-1) para los subconjuntos de linfocitos NK anotados definidos por la agrupación por FlowSOM.

(h-j) IFM (mediana de la expresión del marcador, intervalo de valores: 0-1) de marcadores indicados en linfocitos NK inmaduros CD56^{claro}CD16^{oscuro}, linfocitos NK maduros CD56^{oscuro} y linfocitos NK terminalmente diferenciados CD57^{oscuro} de donantes sanos de la misma edad (HD) y el paciente (semana 53 y semana 75 después del inicio de la FEC). HD (n = 5), los bigotes del diagrama de caja representan los valores mínimo y máximo del conjunto de datos de HD.

Figura 3:

(a)-(d) Porcentaje de células que expresan citocinas dentro de linfocitos NK CD56^{claro}, linfocitos NK CD56^{oscuro}, linfocitos T CD4⁺ de memoria, linfocitos CD4⁺ sin activación previa y linfocitos T CD8⁺ de donantes sanos de la misma edad (HD) y el paciente (semana 53 y semana 75 después del inicio de la FEC). HD (n = 5), los bigotes del diagrama de caja representan los valores mínimo y máximo del conjunto de datos de HD.

Figura 4:

(a) Modelo experimental con transferencia adoptiva de linfocitos T del paciente solos o junto con linfocitos NK en ratones *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* e inducción de autoinmunidad asociada a inhibidores de puntos de control inmunitarios mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1.

(b) Puntuación histopatológica de infiltración de neutrófilos y linfocitos de hígado, piel, pulmón y colon aislados de ratones *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* el día 15 después de la inyección de linfocitos T y NK del paciente como se muestra en (a).

Figura 5:

(a) Esquema de tratamiento de ratones *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* tratados con un anticuerpo anti-PD-1 sin inyección de células derivadas del paciente (control negativo).

(b) Puntuación de la infiltración de neutrófilos en hígado, pulmón, piel y colon aislados de ratones *Rag2^{-/-}H2rg^{-/-}* el día 15 después del inicio del tratamiento como se muestra en (a).

(c) Supervivencia de ratones *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* tratados como se describe en (a).

Figura 6:

(a) Programa de tratamiento: Se trató a los ratones con DSS (3 %), anti-PD1 y FEC como se indica.

(b) Curva de peso de los ratones sin tratar o los tratados con DSS (3 %), anti-PD1 solo o en combinación con FEC como se indica.

(c) La longitud del colon se cuantificó en 5 ratones por grupo. Grupos como se indican en el panel B.

(d) Colon representativo de un ratón por grupo. Grupos como se indican en el panel B.

(e) Sección representativa teñida con HE del colon de los grupos como se indica en el panel B.

(f) Puntuaciones de histopatología del colon de los grupos como se indica en el panel B.

Figura 7:

(a) Programa de tratamiento: A los ratones se les inyectaron por iv células de melanoma B16 y después se les trató con anti-PD1, prednisolona o FEC como se indica.

(b) Supervivencia de ratones inyectados por iv con células de melanoma B16 y después tratados con anti-PD1, prednisolona o FEC.

Ejemplos

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos.

En este caso se informa sobre un paciente que padece de colitis inducida por ipilimumab/nivolumab, refractario a múltiples fármacos inmunosupresores, que consiguió una respuesta completa después de la fotoféresis extracorpórea (FEC) coincidiendo con una expansión de los linfocitos citolíticos naturales (NK) inmunorreguladoras.

Resultados de los ejemplos

Se trató a paciente masculino de 29 años con ipilimumab y nivolumab para melanoma metastásico. Después de dos dosis, el paciente desarrolló dermatitis, tiroiditis, hepatitis y colitis. La colitis se diagnosticó basándose en ulceraciones mucosas macroscópicas y apoptosis intraepitelial y pérdida de criptas identificadas en la biopsia (**Fig. 1a,b**). Aunque la dermatitis, la tiroiditis y la hepatitis se resolvieron después de suspender el tratamiento con ipilimumab/nivolumab y corticoesteroides, el paciente experimentó tres episodios de colitis en las siguientes 20 semanas (CTC-AE II-III°). Estos se trataron con corticoesteroides (en total 23 semanas antes de la FEC), infliximab (2 dosis únicas 18 y 15 semanas antes de la FEC) y ciclosporina (14 semanas antes de la FEC, **Fig. 1a y Tabla 1**).

Como no hubo una respuesta duradera, el paciente recibió FEC. Durante los siguientes 8 meses, se sometió a 2 ciclos de FEC en días consecutivos cada 2-4 semanas. La FEC fue bien tolerada y produjo una respuesta completa (**Fig. 1a**). La inmunosupresión se redujo gradualmente sin rebote de los síntomas. La remisión continua de la colitis se confirmó mediante colonoscopia (**Fig. 1c**). El tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunitarios se suspendió tras la primera manifestación de irAE y nunca se reanudó.

Se analizó el compartimento de leucocitos de sangre periférica en múltiples puntos temporales antes y durante el tratamiento con FEC. Se observó un aumento de 4 veces en los linfocitos NK. (**Fig. 1d-e, Fig. 2a-j**), con un fenotipo inmunorregulador (**Fig. 1f,g**). Además, las citocinas proinflamatorias múltiples eran más bajas en el paciente en comparación con donantes sanos de la misma edad (**Fig. 3a-e**). Respaldando la idea de que los linfocitos NK regulaban la autoinmunidad, la transferencia adoptiva de los linfocitos NK del paciente evitó la irAE en un modelo murino de irAE desencadenado por linfocitos T humanos y tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 de una manera dependiente de la dosis (**Fig. 1h y Fig. 4a,b**). Los experimentos de control confirmaron que la morbilidad estaba mediada por los linfocitos T derivados del paciente. (**Fig. 5**).

La FEC es una terapia establecida para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD, por sus siglas en inglés)⁴ y conduce a un aumento de linfocitos NK en pacientes con EICH⁵. Hasta ahora faltan datos sobre la seguridad y eficacia de la FEC para el tratamiento de irAE. Este informe de caso implica que la FEC puede ser una terapia eficaz para la colitis refractaria asociada a inhibidores de puntos de control mediante la expansión de una población protectora de linfocitos NK.

La FEC reduce los acontecimientos adversos mediados por el sistema inmunitario sin bloquear el efecto antimelanoma

Basándose en los resultados presentados anteriormente (figuras 1-5), que muestran que la fotoféresis extracorpórea (FEC) redujo la colitis relacionada con el sistema inmunitario en un paciente que había sido tratado con inmunoterapia combinada (nivolumab, ipilimumab) para el melanoma metastásico, a continuación se intenta someter a ensayo esto en un modelo *in vivo* para irAE. Para inducir la colitis, se trató a los ratones con DSS al 3 % y anti-PD1 (**Figura 6A**) de acuerdo con informes anteriores (19). El tratamiento redujo el peso corporal de los ratones en consonancia con el desarrollo de colitis y la pérdida de peso se redujo con el tratamiento con FEC (**Figura 6B**). El tratamiento con FEC también aumentó la longitud del colon en comparación con el grupo tratado sólo con anti-PD1 (**Figura 6C, D**). Se informó que la longitud del colon es un parámetro sustituto para la gravedad de la colitis inducida por inmunoterapia (19). De acuerdo con la reducción de la gravedad de la colitis, se observó una infiltración reducida de neutrófilos en la pared del colon de ratones tratados con FEC en comparación con el grupo tratado sólo con anti-PD1 (**Figura 6E, F**). Estos hallazgos indican que la FEC reduce la colitis inducida por anti-PD1 en ratones.

Para comprender si el efecto inmunomodulador de la FEC estaba relacionado con una pérdida de actividad antitumoral, a continuación se trataron ratones que portaban melanoma con anti-PD1 solo o en combinación con el glucocorticoide prednisolona o FEC (**Figura 7A**). Se observó que la prednisolona redujo la supervivencia de los ratones portadores de melanoma en comparación con el grupo tratado sólo con anti-PD1 (**Figura 7B**). Por el contrario, el grupo tratado con anti-PD y FEC tuvo un resultado comparable al del grupo tratado sólo con anti-PD1 (**Figura 7B**). Estos hallazgos indican que la FEC no interfiere con la respuesta anti-melanoma inducida por el tratamiento con anti-PD1.

Análisis de los ejemplos

Análisis del mecanismo: Los linfocitos NK ejercen una diversidad de funciones inmunitarias heterogéneas, incluyendo la actividad antiinflamatoria. En un modelo en ratón de GVHD, la transferencia de linfocitos NK mejoró la supervivencia, que dependía de la señalización intacta de TGF- β ⁶. En otro estudio preclínico de GVHD, los linfocitos NK indujeron una reducción mediada por perforina y ligando Fas de la proliferación de linfocitos T alorreactivos y un aumento de la apoptosis de linfocitos T⁷. Una población c-Kit⁺ CD27⁻ CD11b⁺ se identificó como un subconjunto de linfocitos NK efectores específicos que era capaz de controlar la GVHD sin interferir con el efecto de injerto contra leucemia (GVL, por sus siglas en inglés)⁸. En seres humanos, la falta de coincidencia del ligando del receptor similar a inmunoglobulina de linfocitos citolíticos (KIR, por sus siglas en inglés) en alo-HCT haploidentico en dirección de GVH redujo el riesgo de GVHD que fue mediado por linfocitos NK⁹.

La FEC es un tratamiento eficaz para la GVHD. Anteriormente se había observado un aumento de linfocitos NK durante la FEC para la GVHD crónica extensa¹⁰. Los pacientes con GVHD aguda tienen una mayor frecuencia de subconjuntos de NK CD56^{cl} con expresión más fuerte de NKG2D y CD62L¹¹. En el mismo estudio, los linfocitos NK CD56⁻ CD16⁺ con mayor expresión de CD57 y CD11 b aumentaron en pacientes con cGVHD crónica. La FEC desplazó las poblaciones de linfocitos NK hacia un fenotipo más inmunorregulador con protección de un subconjunto CD57⁺ NKG2C⁺ CD56^{oscuro} antivirico y antileucémico especializado¹¹. La hipótesis es que mecanismos similares podrían ser responsables de los efectos protectores de los linfocitos NK contra irAE. Al comparar el compartimento de linfocitos NK en el paciente con el de controles sanos de la misma edad y sexo, se observó una regulación negativa de la expresión de CD16, en particular en linfocitos NK CD56^{oscuro}. CD16 es el FcR γ III, un receptor de

linfocitos NK activador que puede inducir una fuerte producción de citocinas. Estudios previos muestran que la eliminación de CD16 podría ser un mecanismo inmunorregulador para prevenir la autoinmunidad¹². La regulación negativa de CD16 modula las respuestas de los linfocitos NK y contribuye al mantenimiento de la homeostasis inmunitaria de las vías dependientes de anticuerpos y linfocitos T¹³. Respaldo esta hipótesis, la expresión de GM-CSF, IFN- γ , TNF e IL-2 fue inferior en los linfocitos NK del paciente en comparación con el grupo de control.

Métodos empleados en los ejemplos

Procedimiento de FEC:

La fotoféresis extracorpórea se realizó en un sistema de fotoféresis Therakos CellEx con administración de Methoxsalen (Uvadex®). Se realizaron dos procedimientos en días consecutivos y se procesaron 1500 ml de sangre durante cada procedimiento. Se recogieron todas las muestras humanas después de la aprobación del comité de ética de la Universidad Albert Ludwigs, Friburgo, Alemania (número de protocolo 300/16) y previo consentimiento informado por escrito de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Modelo murino de irAE

Se aislaron linfocitos T de la sangre periférica del paciente usando selección negativa con el kit de aislamiento de linfocitos T Pan (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los linfocitos NK se aislaron de la sangre periférica del paciente usando el kit de aislamiento de linfocitos NK, humano (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A los ratones *Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}* se les inyectaron por vía intravenosa 3×10^5 linfocitos T con o sin 4×10^4 o 4×10^5 linfocitos NK. Desde el día 1 hasta el día 22 después de la inyección, a los ratones se les trató dos veces por semana con 8 mg/kg de peso corporal de anticuerpo anti-PD-1 (clon J43) y una vez por semana con 1 mg/kg de peso corporal de LPS, ambos aplicados mediante una inyección intraperitoneal (**Fig. 4a**). Se recogieron secciones de piel, hígado, colon y pulmón el día 15 después de la inyección de linfocitos T humanos, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se puntuaron basándose en la caracterización histopatológica de los irAE humanos, incluyendo infiltración de linfocitos y neutrófilos, abscesos de criptas y células apoptóticas¹⁴¹⁵ por un patólogo experimentado. Todos los estudios con animales habían sido aprobados por el comité de revisión institucional de la Universidad sobre el uso y cuidado de animales de laboratorio de la Universidad Albert-Ludwigs de Friburgo, Alemania (Números de aprobación de protocolo: G17-049, X13-07J, X15-10A).

Citometría de flujo

Para controlar las poblaciones de linajes de linfocitos durante y después de la terapia con FEC, se aislaron linfocitos de sangre periférica del paciente y se tiñeron con un panel normalizado de anticuerpos contra CD45, CD19, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56 y HLA-DR como parte del diagnóstico de rutina. Los datos se compensaron en FlowJo (V10), los linfocitos se exportaron y usando el entorno R¹⁷ se realizó la agrupación por tSNE y FlowSOM como se describió anteriormente¹⁶.

Para la fenotipificación multiparamétrica de linfocitos NK y el análisis de citocinas, se aislaron linfocitos de sangre periférica usando un medio de gradiente de densidad (Lymphoprep, STEMCELL Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tiñeron linfocitos de sangre periférica descongelados con los anticuerpos enumerados en la Tabla S2. Se usó el kit Zombie Aqua Fixable Viability (Biolegend) para la discriminación entre vivos/muertos. Para la producción de citocinas, las células se estimularon con 50 ng/ml de PMA (Axon Lab) y 500 mg/ml de Ionomicina (Sigma) en presencia de GolgiPlug (BD Biosciences) durante 4 h. La tinción intracelular se realizó usando el kit BD Cytfix/CytoPerm (BD Biosciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los datos se obtuvieron en un citómetro de flujo Aurora (Cytex) y se compensaron usando el software FlowJo (Flowjo V10.6.1, LLC). Las poblaciones de células especificadas en las figuras se exportaron y analizaron usando el entorno R¹⁷. Los datos se procesaron para la agrupación en clústeres por FlowSOM como se describe¹⁶. Para la reducción de dimensionalidad se usó el paquete UMAP¹⁸.

Estadísticas

El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism Lab V7.0. Las comparaciones de dos grupos se realizaron mediante ensayos t de Student de dos vías de muestras independientes. Las diferencias en la supervivencia (curvas de supervivencia de Kaplan-Meier) se evaluaron mediante el ensayo de Mantel Cox (rango logarítmico). Los datos se presentan como media $\pm$ ETM si no se indica otra cosa. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

Tablas de los ejemplos

Tabla 1. Enfermedad y curso de tratamiento.

Episodio	Punto temporal previo a la FEC (semanas)	Gravedad de la diarrea máxima (CTC-AE)	Tratamiento al inicio del episodio	Nuevo tratamiento añadido durante el episodio
1	20	3	Metilprednisolona 0,3 mg/kg de peso corporal (previamente administrada para la hepatitis autoinmunitaria)	Metilprednisolona 2 mg/kg de PC Infliximab 5 mg/kg de peso corporal
2	16	3	Metilprednisolona 0,1 mg/kg de peso corporal	Prednisona 1 mg/kg de peso corporal Infliximab 5 mg/kg de peso corporal Ciclosporina A 3 mg/kg de peso corporal
3	2	3	Ciclosporina A 1,25 mg/kg de peso corporal Prednisona 7,5 mg abs	FEC

El paciente tuvo su primer episodio de colitis 20 semanas antes del inicio de la FEC. En ese punto temporal había sido tratado durante 3 semanas con esteroides por su anterior hepatitis, tiroiditis y dermatitis relacionadas con inhibidores de puntos de control inmunitarios. La colitis se produjo durante la reducción gradual de los esteroides. Por lo tanto, se aumentó la dosis de esteroides y debido a una respuesta insuficiente, se administró infliximab 5 mg/kg de peso corporal una vez. Los síntomas desaparecieron. Tras la reducción gradual de los esteroides, el paciente experimentó su segundo episodio de colitis, 16 semanas antes del inicio de la FEC. Fue tratado con una dosis mayor de metilprednisolona y una segunda dosis de infliximab. La diarrea fue refractaria a esta terapia y en consecuencia se añadió ciclosporina A. Los síntomas desaparecieron nuevamente. A medida que se redujo la dosis de ciclosporina A, el paciente tuvo un tercer episodio de colitis. En este caso, se inició tratamiento con FEC. Dos semanas después del inicio de la FEC, el paciente tenía una frecuencia de evacuación intestinal normal. El tratamiento con ciclosporina A se suspendió 8 semanas después del inicio de la FEC, el tratamiento con corticoesteroides se suspendió 12 semanas después del inicio de la FEC sin ningún rebote de los síntomas. La FEC se realizó durante un total de 32 semanas. Con un seguimiento de 11 meses después de la última FEC, el paciente permaneció en remisión completa con respecto a ambos, el irAE y la manifestación del melanoma.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo con células humanas.

Antígeno	Fluorocromo	Clon	Fabricante
CD16	BUV495	3G	BD
CD14	BUV563	M5E2	BD
CD45RO	BUV615	UCHL1	BD
CD3	BUV661	UCHT1	BD
CD45	BUV805	HI-30	BD
NKp46	BV421	9E2	Biolegend
CD56	BV480	NCAM16.2	BD
CD8	BV570	RPA-T8	Biolegend
CD4	BV711	0KT4	Biolegend
CD4	APC-Cy7	RPA-T4	BD
CD94	BV786	HP-3D9	BD
CD57	PerCP-Cy5.5	HNK-1	Biolegend
TIGIT	PE	MBSA43	eBioscience
CD62L	PE-Cy5	DREG-56	BD
KLRG1	PE-Cy7	13F12F2	ThermoScientific
NKG2D	APC	1D11	Biolegend
NKG2C	AF488	134591	R&D
CD19	BUV737	SJ25C1	BD
CD19	APC-Vio770	REA675	Miltenyi
IL-2	BV711	MQ1-17H12	Biolegend
TNF	BV785	Mab11	Biolegend
IFN gamma	PE-Cy7	4S.B3	eBioscience
GM-CSF	PE	BVD2-21C11	BD

Referencias

1. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. *N Engl J Med* 2015; 373:23-34.
2. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. *Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. *N Engl J Med* 2017; 377:1345-56.
3. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, et al. *Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma*. *N Engl J Med* 2015; 372:2006-17.
4. Zeiser R, Blazar BR. *Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy*. *N Engl J Med*; 2017; 377:2167-79.
5. Ni M, Wang L, Yang M, et al. *Shaping of CD56(bri) Natural Killer Cells in Patients With Steroid-Refractory/Resistant Acute Graft-vs.-Host Disease via Extracorporeal Photopheresis*. *Front Immunol* 2019; 10:547.
6. Asai O, Longo DL, Tian ZG, et al. *Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation*. *J Clin Invest* 1998; 101:1835-42.
7. Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. *NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects*. *Blood* 2010; 115:4293-301.
8. Meinhardt K, Kroeger I, Bauer R, et al. *Identification and characterization of the specific murine NK cell subset supporting graft-versus-leukemia- and reducing graft-versus-host-effects*. *Oncoimmunology* 2015; 4:e981483.
9. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. *Science* 2002; 295:2097-100.
10. Alcindor T, Gorgun G, Miller KB, et al. *Immunomodulatory effects of extracorporeal photochemotherapy in patients with extensive chronic graft-versus-host disease*. *Blood* 2001; 98:1622-5.
11. Ni M, Wang L, Yang M, et al. *Shaping of CD56(bri) Natural Killer Cells in Patients With Steroid-Refractory/Resistant Acute Graft-vs.-Host Disease via Extracorporeal Photopheresis*. *Front Immunol* 2019; 10:547.
12. Romee R, Foley B, Lenvik T, et al. *NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17)*. *Blood* 2013; 121:3599-608.
13. Goodier MR, Lusa C, Sherratt S, Rodríguez-Galán A, Behrens R, Riley EM. *Sustained Immune Complex-Mediated Reduction in CD16 Expression after Vaccination Regulates NK Cell Function*. *Front Immunol* 2016; 7:384.
14. Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, et al. *Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*. *J Clin Oncol* 2006; 24:2283-9.
15. Johncilla M, Misdrabi J, Pratt DS, et al. *Ipilimumab-associated Hepatitis: Clinicopathologic Characterization in a Series of 11 Cases*. *Am J Surg Pathol* 2015; 39:1075-84.
16. Brummelman J, Haftmann C, Nunez NG, et al. *Development, application and computational analysis of high-dimensional fluorescent antibody panels for single-cell flow cytometry*. *Nat Protoc* 2019; 14:1946-69.
17. Equipo RDC. *A language and Environment for Statistical Computing*. *R Foundation for Statistical Computing* 2010.
18. McInnes L, Healy J, Melville J. *UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction*. *arXiv* 6, 03426v03422 (2018).
19. Perez-Ruiz E, Minute L, Otano I, Álvarez M, et al. *Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy*. *Nature*. Mayo de 2019; 569(7756):428-432.
20. Jackson Leanne K, et al. *Oral health in oncology: impact of immunotherapy*. *Supportive Care in Cancer*. Septiembre de 2014; 23(1):1-3.
21. Trinh Saralinh, et al. *Management of Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: A Minireview of Current Clinical Guidelines*. *Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing*. Junio de 2019; 6(2):154.

22. Documento WO 99/02215

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener linfocitos NK inmunorreguladores que comprende las etapas de

- 5 - proporcionar una muestra derivada de una muestra de sangre de un sujeto que ha recibido una terapia con inhibidores de puntos de control y muestra síntomas o padece acontecimientos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE) que comprenden colitis autoinmunitaria,
- añadir 8-metoxipsoraleno a la muestra y
- someter la muestra a irradiación UVA,

10 en donde añadir 8-metoxipsoraleno a la muestra y someter la muestra a irradiación UVA generan o inducen la formación de linfocitos NK inmunorreguladores en la muestra.

15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la terapia con inhibidores de puntos de control se suspendió después de que se produjesen síntomas y/o manifestaciones de irAE en dicho sujeto, o en donde los síntomas y/o manifestaciones de irAE se produjeron después de que se suspendiese la terapia con inhibidores de puntos de control, y/o en donde los síntomas y/o manifestaciones de irAE se mantuvieron después de que se suspendiese la terapia con inhibidores de puntos de control.

20 3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el sujeto padece cáncer, tal como un melanoma maligno u otro cáncer tratable mediante terapia con inhibidores de puntos de control.

25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto está recibiendo fármacos inmunosupresores, tales como esteroides, corticoesteroide, ciclosporina y/o anticuerpos anti-TNF (por ejemplo, infliximab) y/o es refractario a fármacos inmunosupresores.

30 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la terapia con inhibidores de puntos de control comprende la administración de al menos uno de entre anticuerpos anti-CTLA4 y anticuerpos anti-PD-1.

Fig. 1

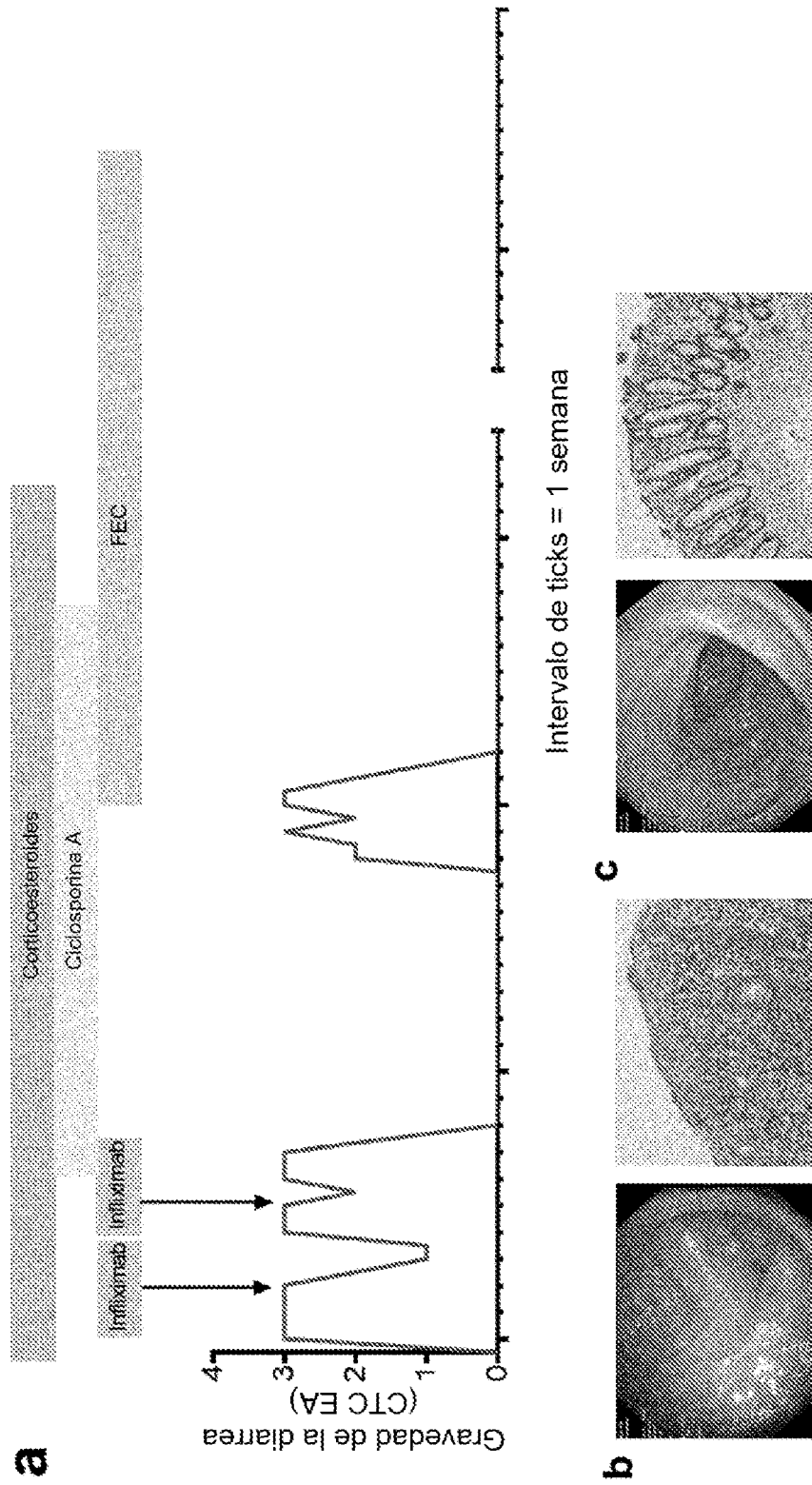


Figura 1 (continuación)

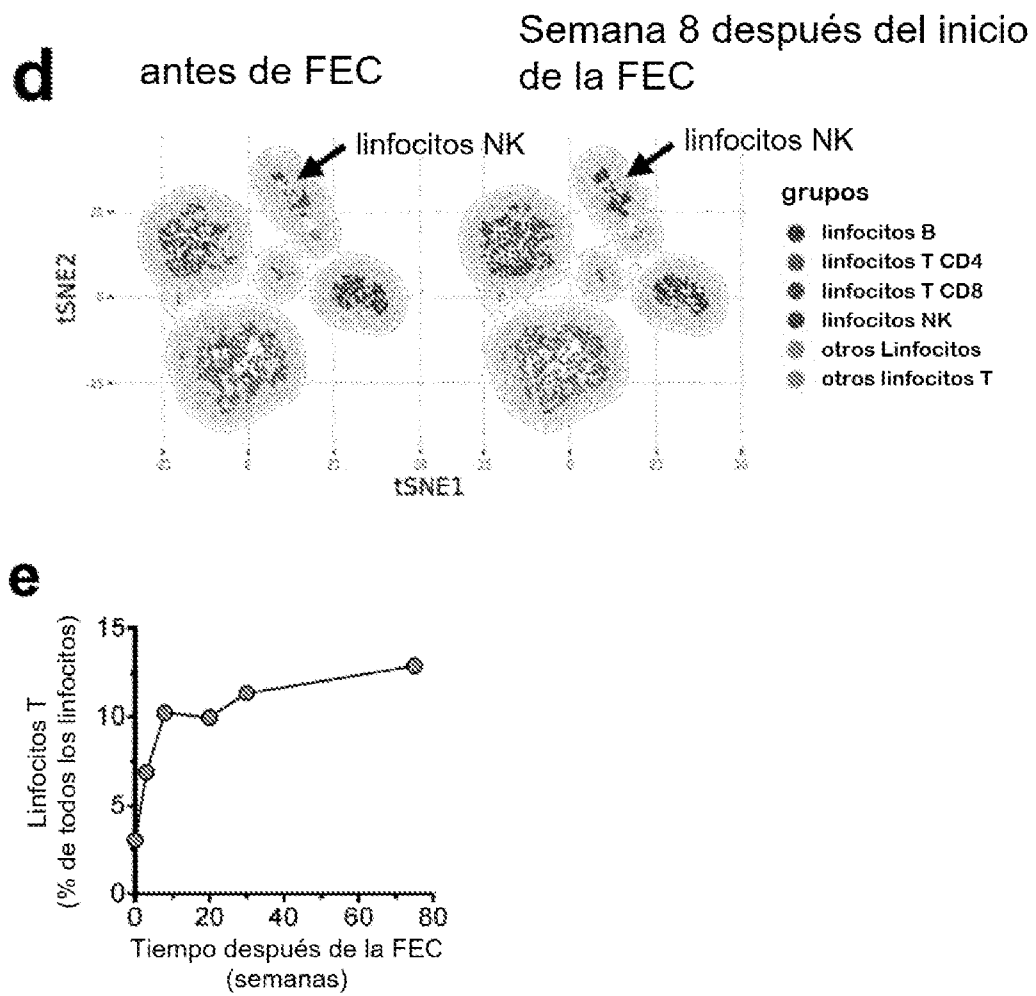


Figura 1 (continuación)

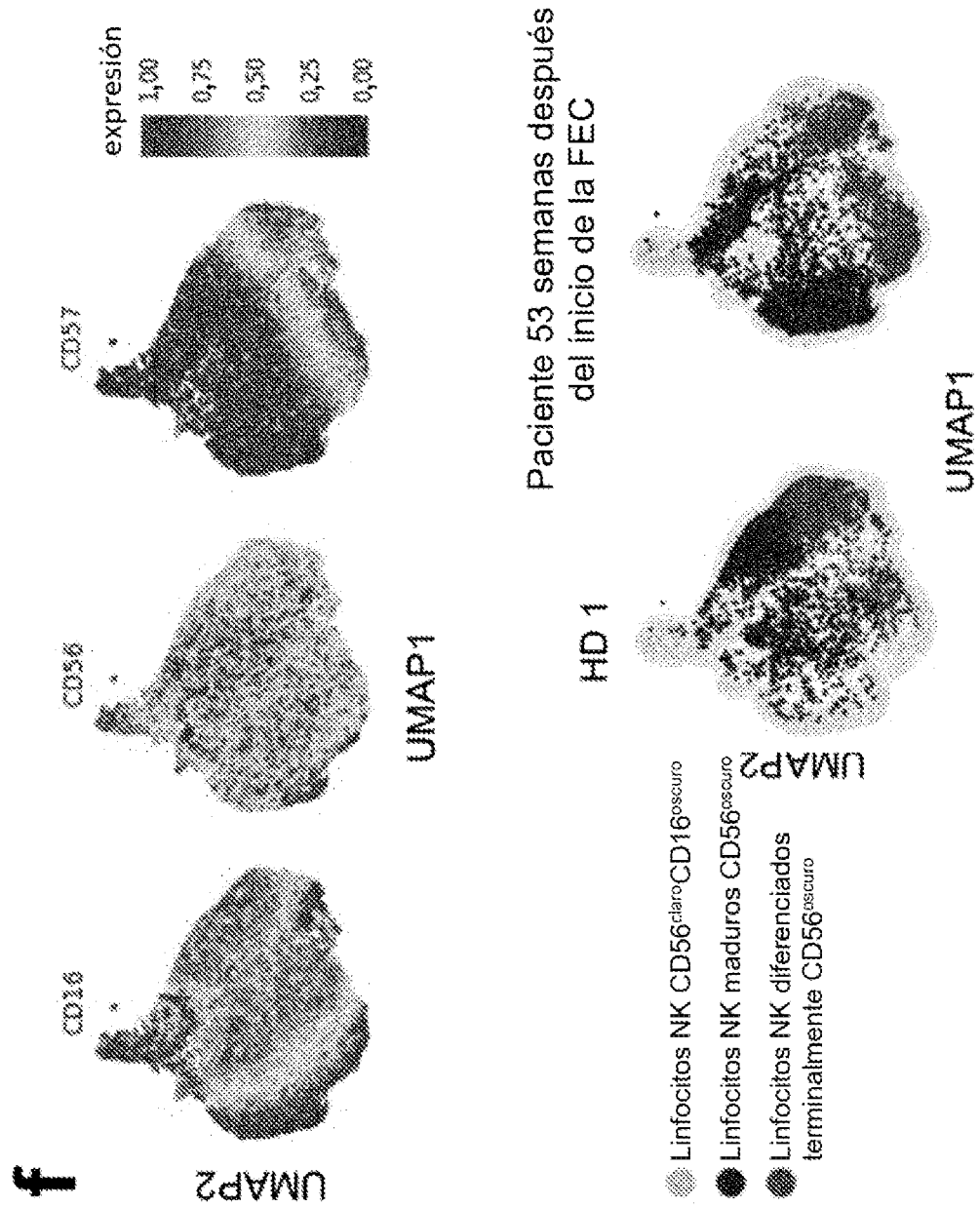


Figura 1 (continuación)

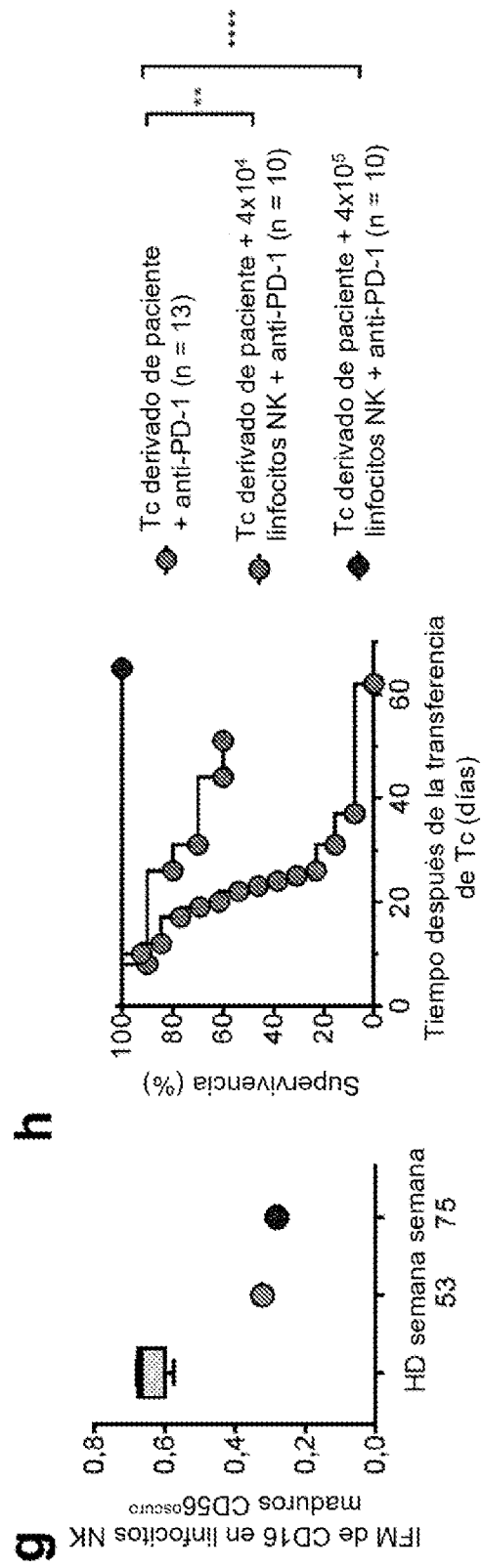


Fig. 2

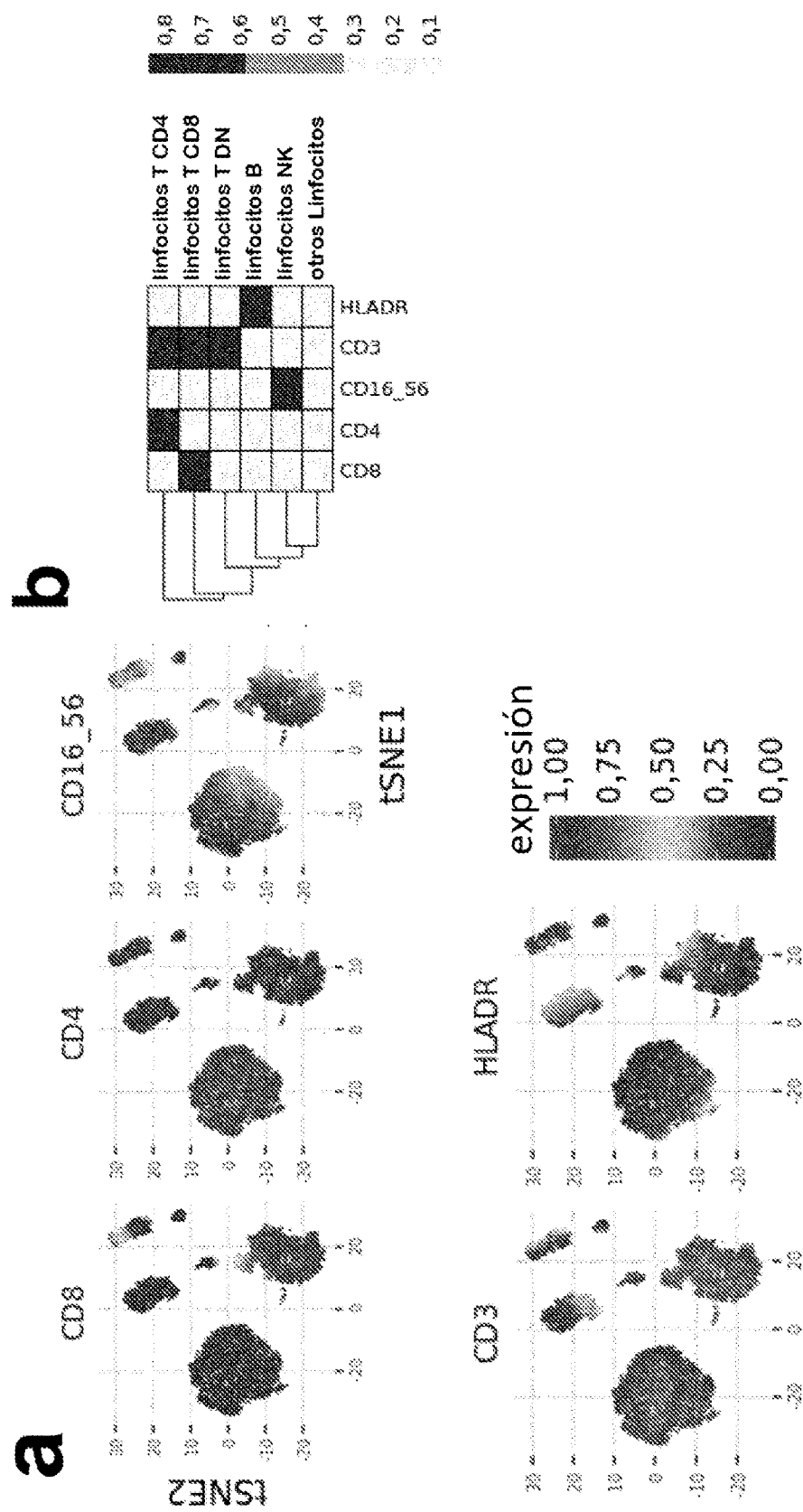


Figura 2 (continuación)

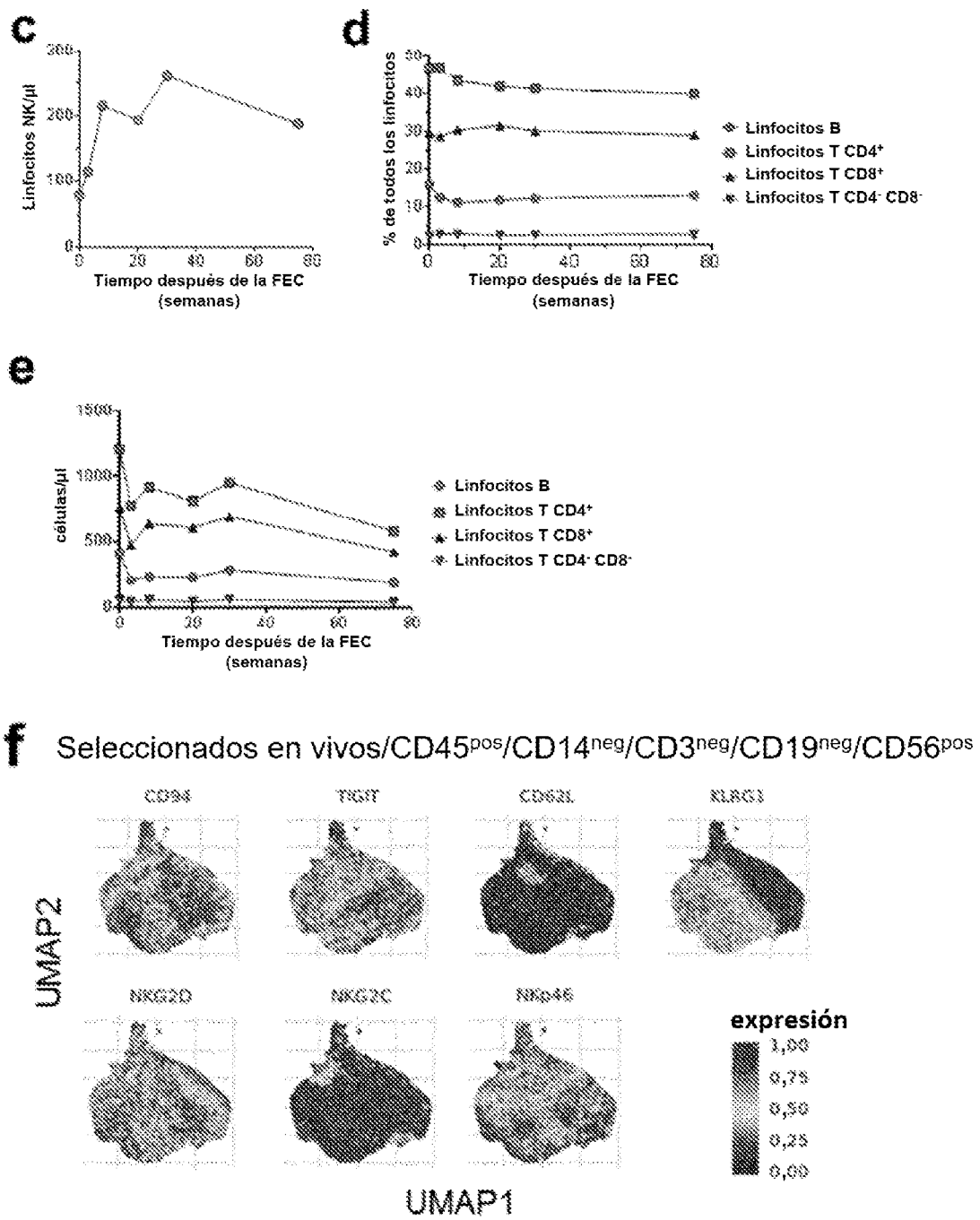


Figura 2 (continuación)

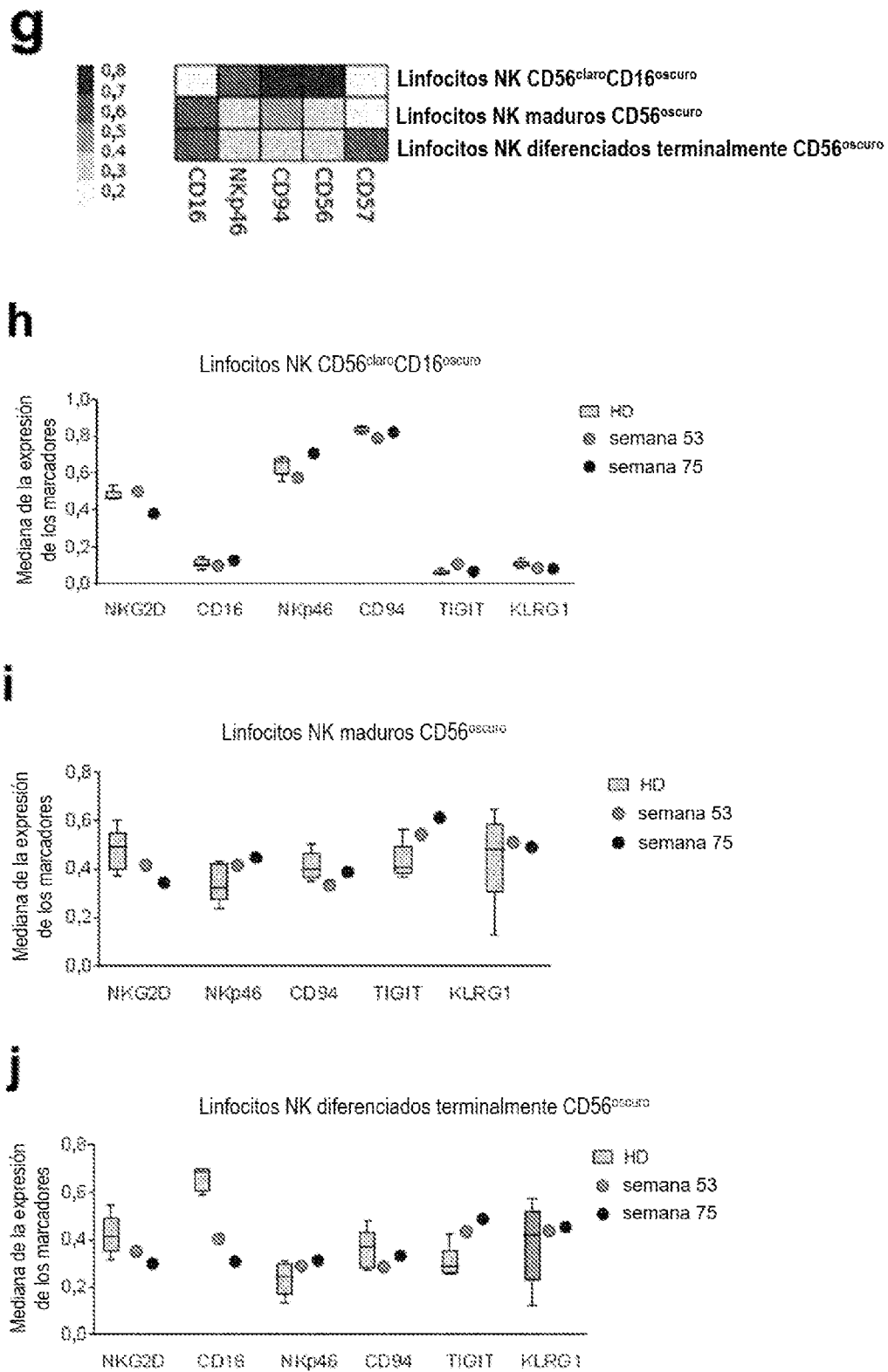


Fig. 3

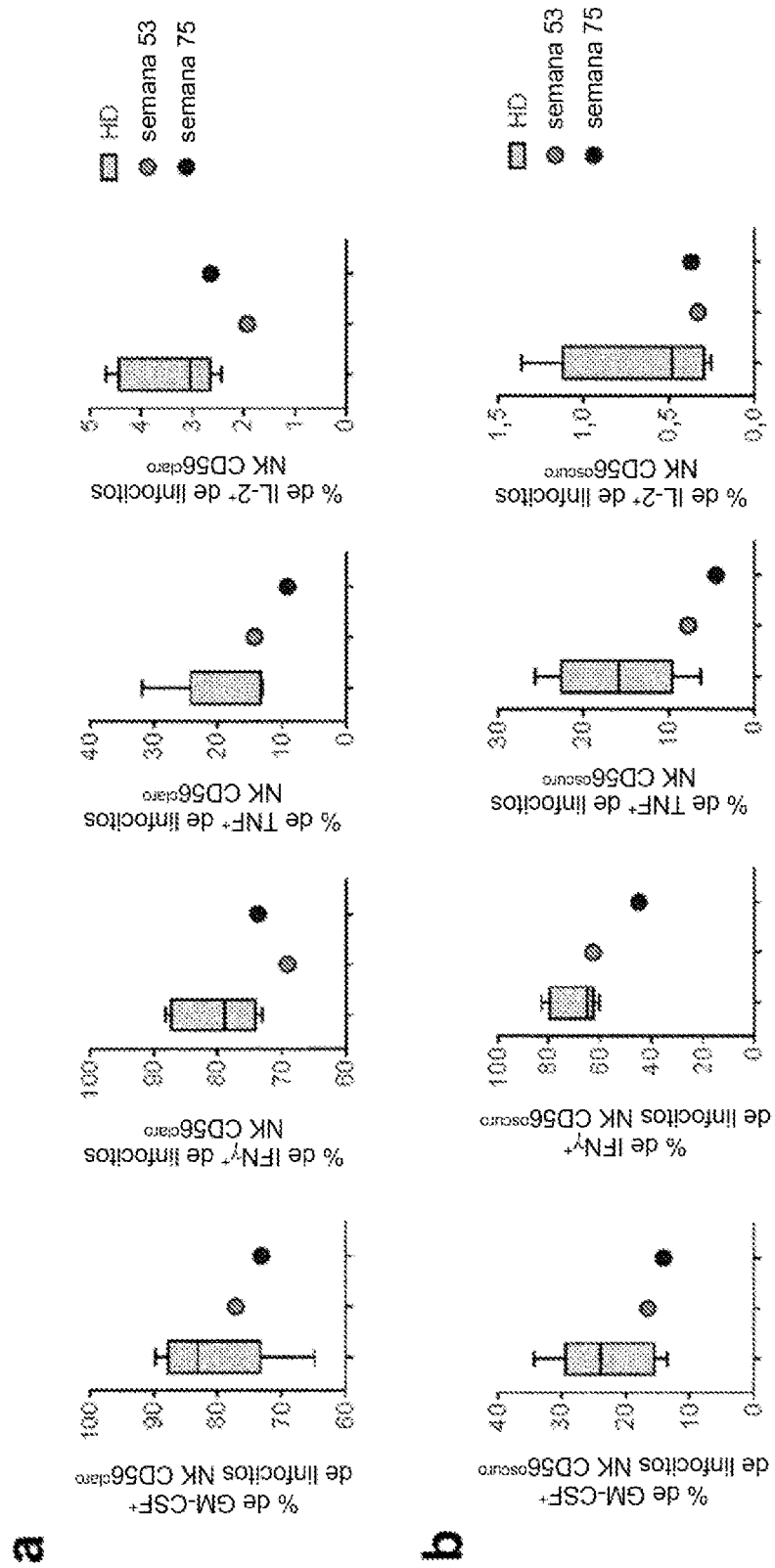


Figura 3 (continuación)

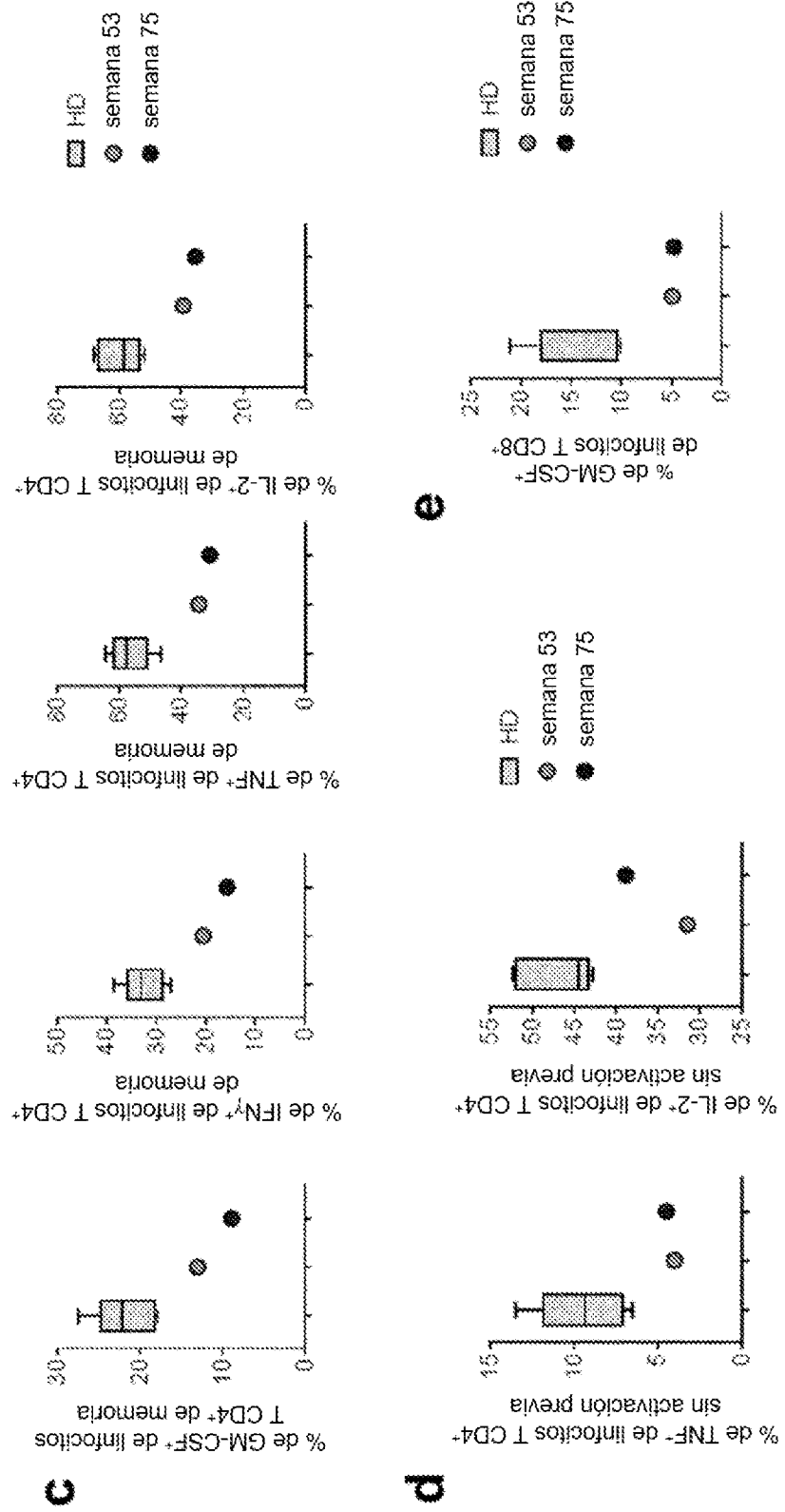


Fig. 4

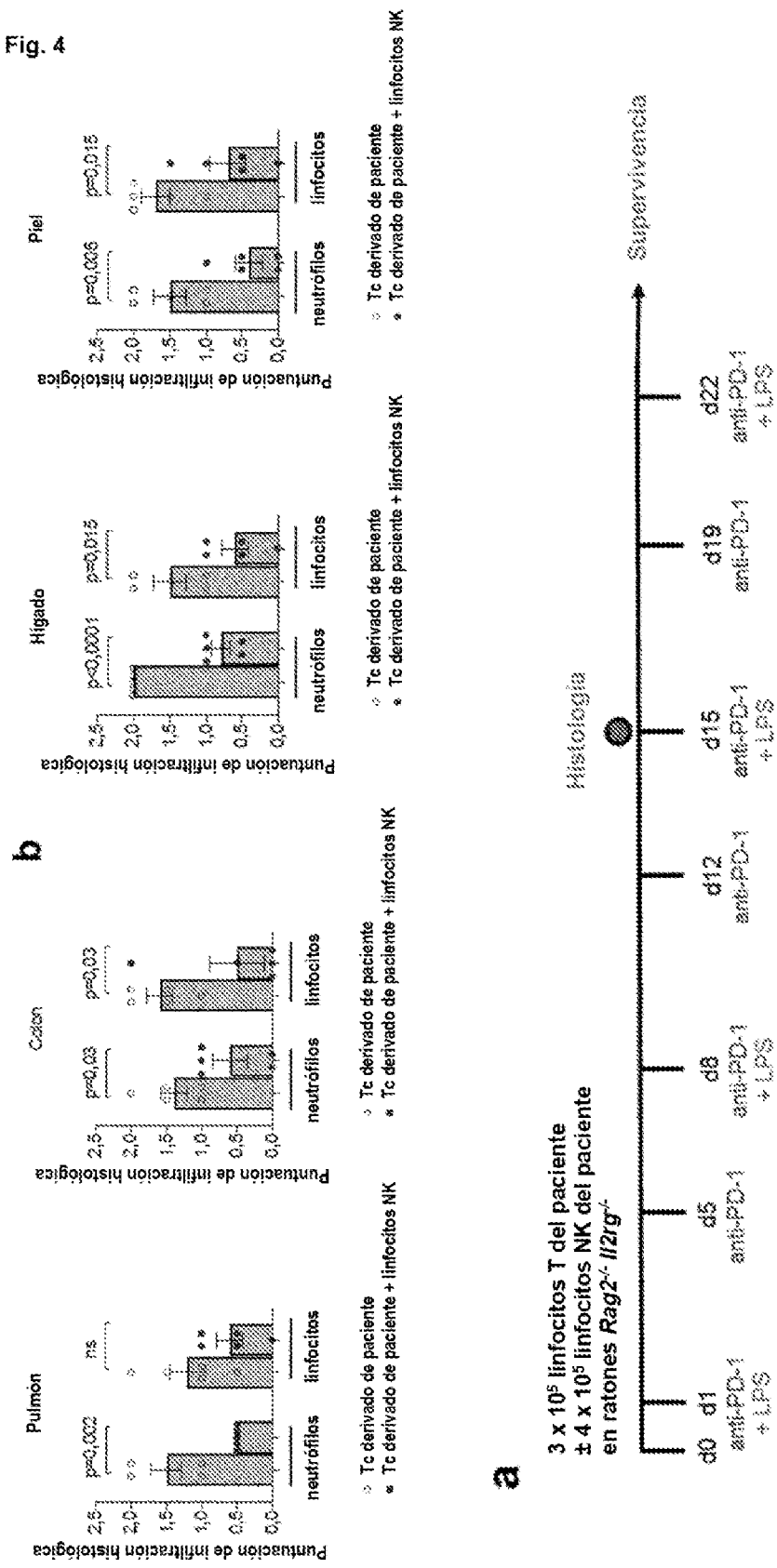


Fig. 5

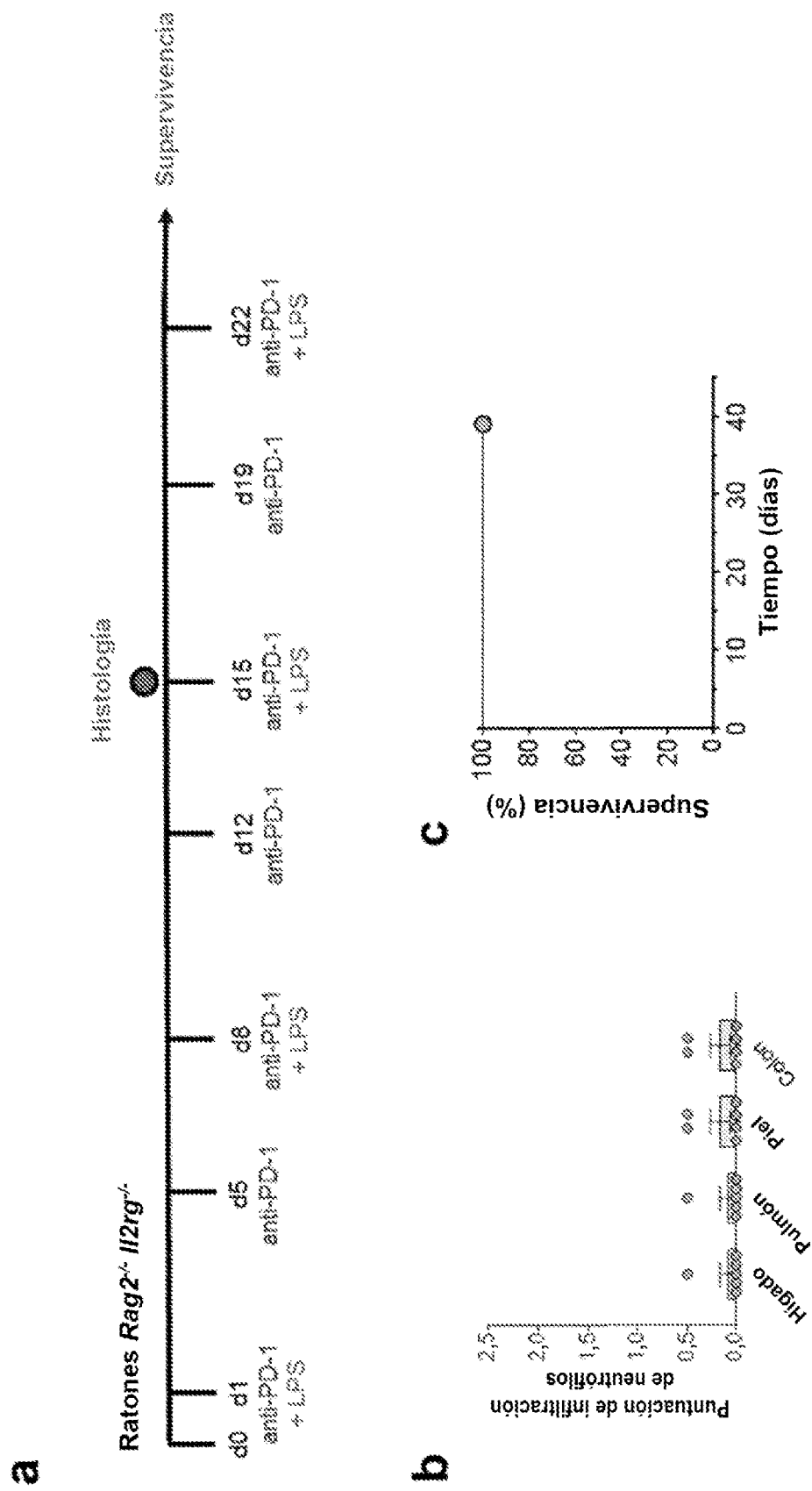


Figura 6

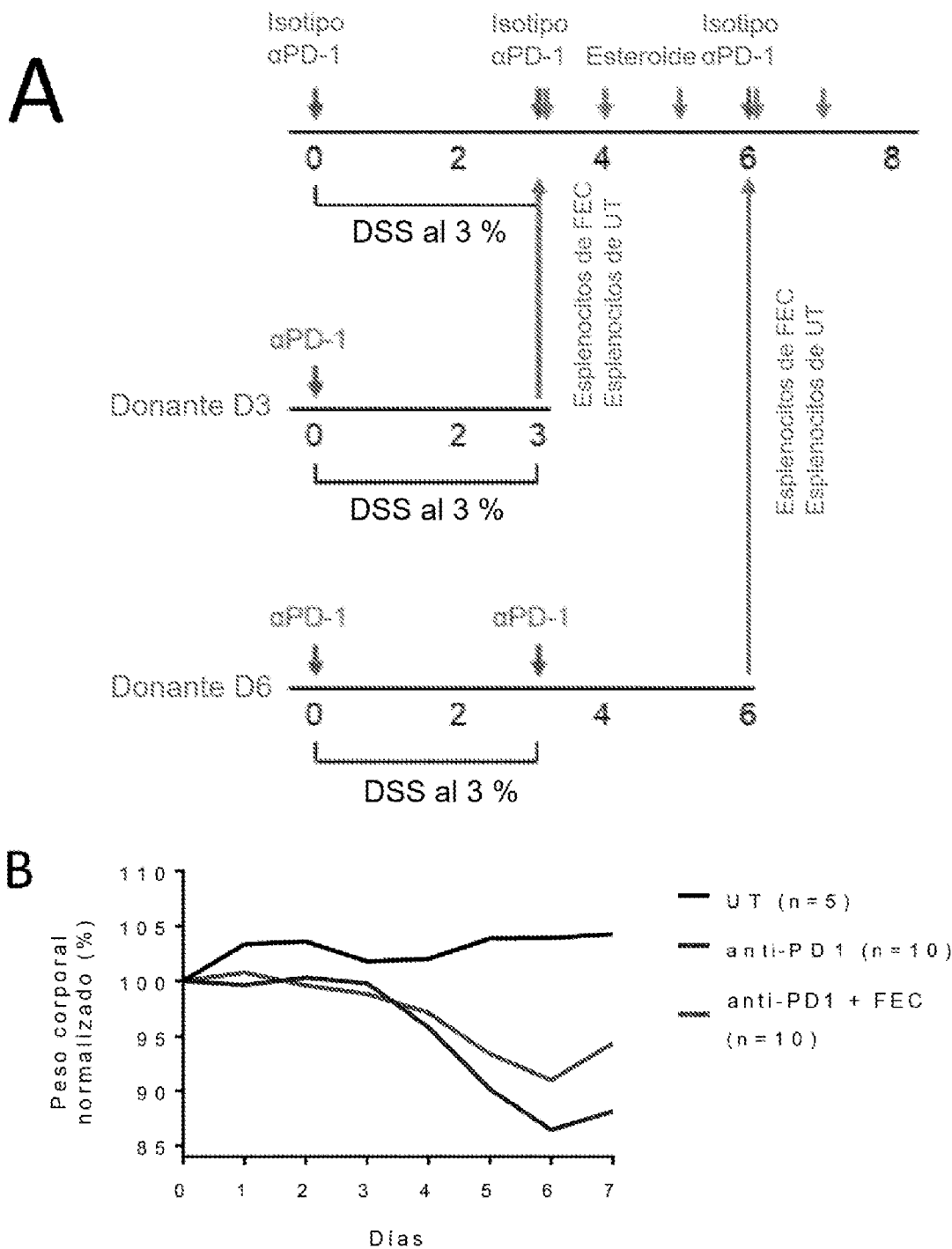
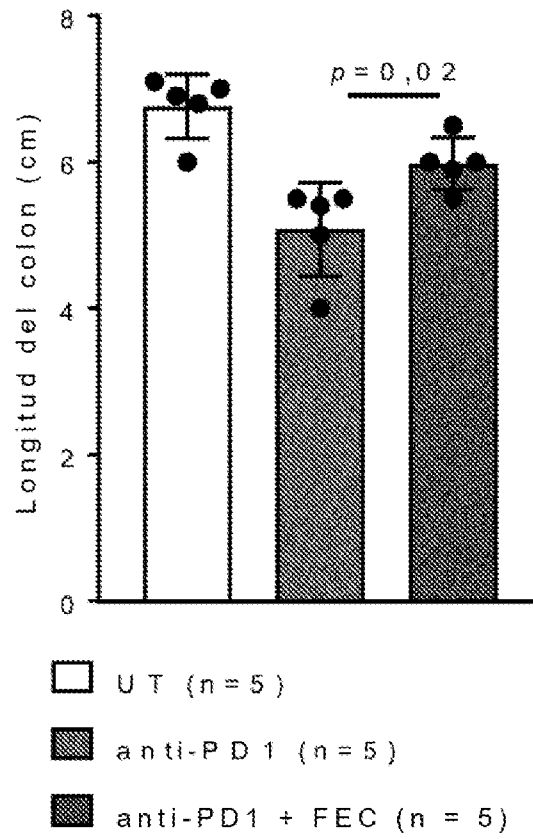


Figura 6 (continuación)

C



D

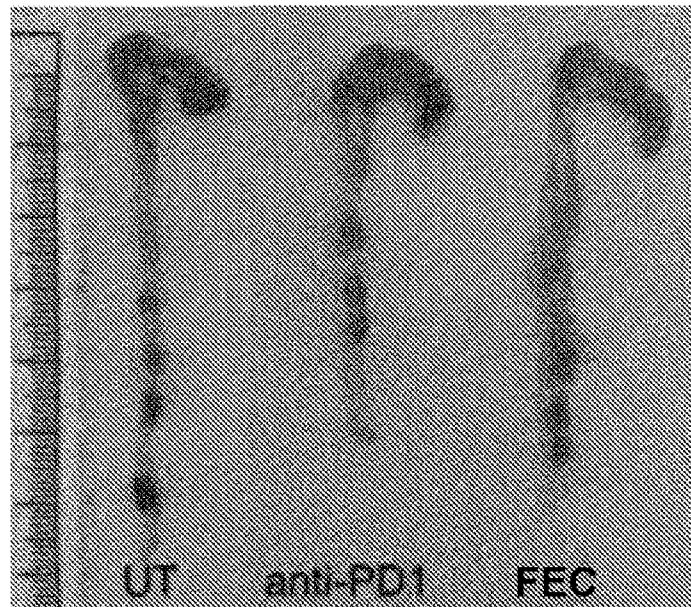


Figura 6 (continuación)

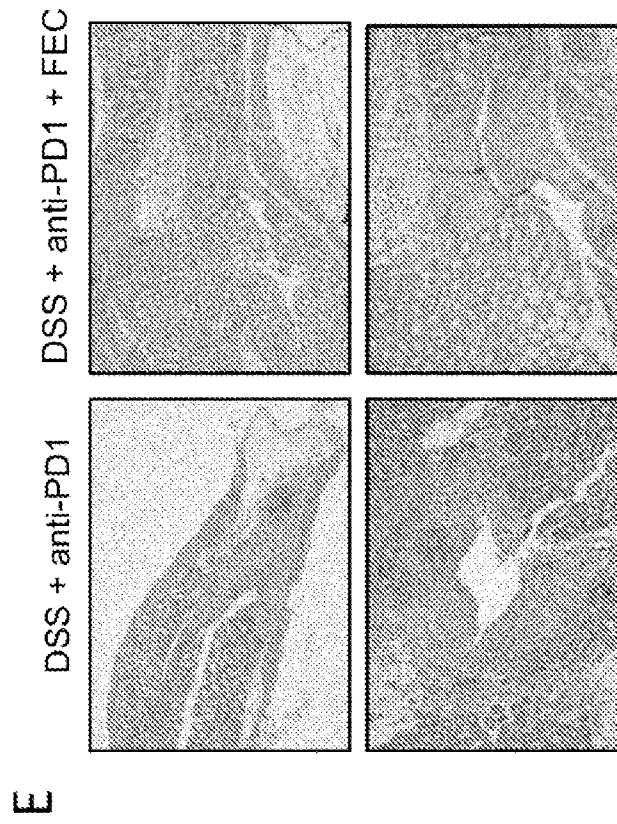
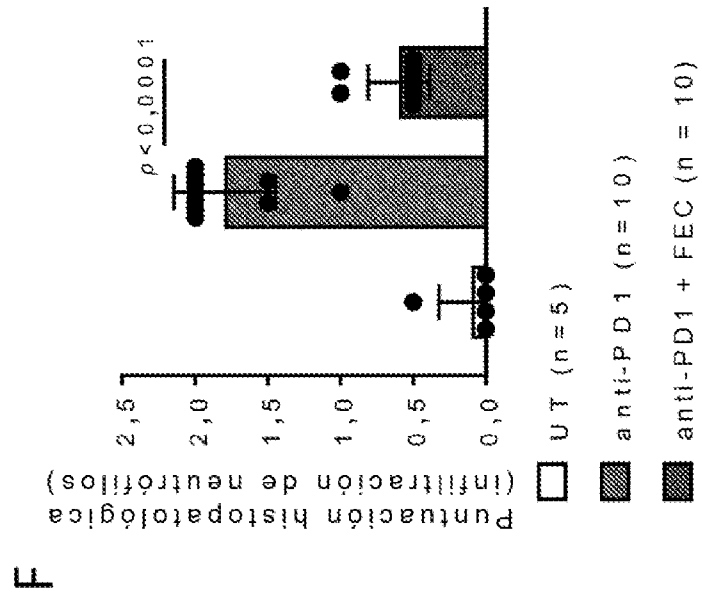


Figura 7

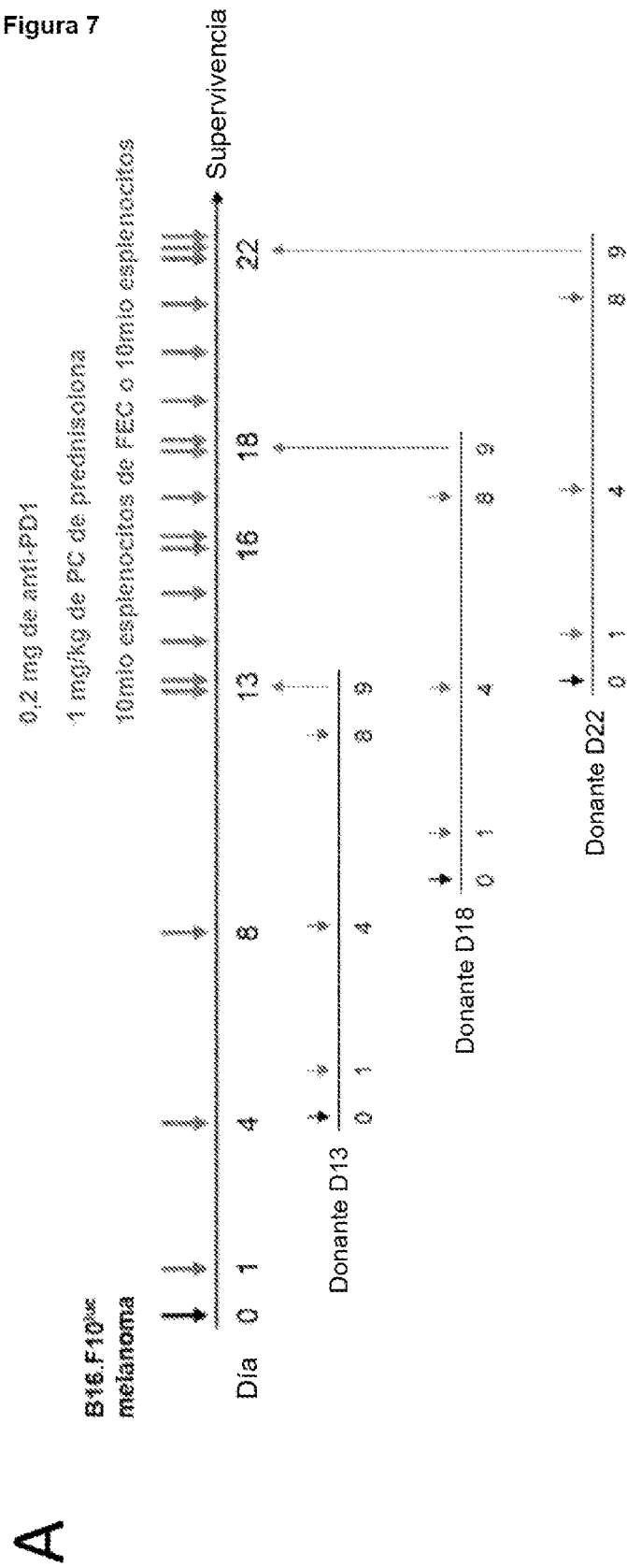


Figura 7 (continuación)

