

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 098**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2010** **PCT/US2010/054608**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011** **WO11053750**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2010** **E 10827507 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2496244**

54 Título: **Inmunoterapia resistente a fármaco para el tratamiento de un cáncer**

30 Prioridad:

02.11.2009 US 257136 P

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

19.09.2017

73 Titular/es:

CHILDREN'S HEALTHCARE OF ATLANTA, INC.
(50.0%)

1600 Tullie Circle NE
Atlanta, GA 30329, US y
THE UAB RESEARCH FOUNDATION (50.0%)

72 Inventor/es:

SPENCER, H. TRENT;
DASGUPTA, ANINDYA y
LAMB, LAWRENCE S.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 633 098 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoterapia resistente a fármaco para el tratamiento de un cáncer

5 Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica la prioridad a la solicitud provisional americana Nº 61/257.136, presentada el 2 de noviembre de 2009.

10 Declaración en relación con lo federalmente financiado

Investigación o desarrollo

15 Esta invención se realiza con soporte del gobierno bajo la subvención del NIH Nº HL 087969-01A1 concedida por el "US National Institutes of Health" del gobierno de los Estados Unidos. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Campo técnico

20 La presente descripción generalmente se refiere a métodos para combinar quimioterapia e inmunoterapia para el tratamiento de un cáncer. Los métodos también se refieren a la generación de una línea celular inmune citotóxica resistente a fármaco y a sus usos junto con fármacos citotóxicos.

Antecedentes

25 Aunque se ha realizado un progreso destacado en los campos de la detección del cáncer y la biología celular del tumor, el tratamiento del cáncer en fase tardía y metastásico sigue siendo un reto muy importante. Los agentes de quimioterapia citotóxicos siguen estando entre los tratamientos anticancerosos más usados y empleados con éxito. Sin embargo, no son uniformemente eficaces, y la introducción de estos agentes con terapias novedosas, tales como inmunoterapias, es problemático. Por ejemplo, los agentes de quimioterapia pueden ser perjudiciales para el establecimiento de células inmunocompetentes antitumorales fuertes debido a los perfiles de toxicidad no específica de los agentes. Las terapias basadas en molécula pequeña que se dirigen a las rutas de proliferación celular también pueden dificultar el establecimiento de la inmunidad antitumoral. Sin embargo, si se pueden combinar los regímenes de quimioterapia que son transitoriamente eficaces con novedosas terapias con célula inmunocompetente, entonces, se podría conseguir mejoramiento significativo en terapia antineoplásica.

30 Se han identificado varios genes resistentes a fármaco que se pueden usar potencialmente para conferir resistencia a fármaco a células dirigidas, y los avances en las técnicas de terapia génica han hecho posible ensayar la viabilidad de usar estos genes en estudios de terapia génica de resistencia a fármaco (Sugimoto y col., (2003) *J. Gene Med.* 5:366-376; Spencer y col., (1996) *Blood* 87:2.579-2.587; Takebe y col., (2001) *Mol. Ther.* 3:88-96; Kushman y col., (2007) *Carcinogenesis*. 28:207-214; Nivens y col., (2004) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 53:107-115; Bardenheuer y col., (2005) *Leukemia* 19:2.281-2.288; Zielske y col., (2003) *J. Clin. Invest.* 112:1.561-1.570). Por ejemplo, se usó una estrategia de ARN de horquilla pequeña para disminuir los niveles de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT), que configuró resistencia a 6-tioquanina (Porter & DeGregori (2008) *Gene Ther.* 112:4.466-4.474). También, el gen resistente a fármaco MGMT codificante de la alquil guanina transferasa humana (AGTh) es una proteína de reparación de ADN que confiere resistencia a los efectos citotóxicos de los agentes alquilantes, tales como nitrosoureas y temozolomida (TMZ). 6-bencilguanina (6-BG) es un inhibidor de AGT que potencia la toxicidad de nitrosourea y se administra conjuntamente con TMZ para potenciar los efectos citotóxicos de este agente. Diversas formas mutantes de MGMT que codifican variantes de AGT son altamente resistentes a la inactivación por 6-BG, pero conservan su capacidad de reparar el daño de ADN (Maze y col., (1999) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290:1.467-1.474). Se ha mostrado que la terapia de gen resistente a fármaco basado en P140KMGMt confiere quimioprotección a células de ratón, perro, macacos rhesus y humano, específicamente células hematopoyéticas (Zielske y col., (2003) *J. Clin. Invest.* 112:1.561-1.570; Pollok y col., (2003) *Hum. Gene Ther.* 14:1.703-1.714; Gerull y col., (2007) *Hum. Gene Ther.* 18:451-456; Neff y col., (2005) *Blood* 105:997-1002; Larochelle y col., (2009) *J. Clin. Invest.* 119:1.952-1.963; Sawai y col., (2001) *Mol. Ther.* 3:78-87).

50 El glioblastoma multiforme (GBM) es el tipo más común y agresivo de tumor cerebral primario en seres humanos, involucrando a las células gliales y representando el 52 % de todos los casos de tumor de parénquima cerebral y el 20 % de todos los tumores intracraneales. A pesar de ser la forma más prevalente de tumor cerebral primario, los GBM se dan en solamente 2 a 3 casos por cada 100.000 personas en Europa y Norte de América. El nombre estándar para este tumor cerebral es "glioblastoma"; presenta dos variantes: glioblastoma de célula gigante y gliosarcoma. Los glioblastomas son también un importante tumor cerebral del perro, y la investigación está en curso para usar este como modelo para desarrollar tratamientos en humanos.

65 El glioblastoma tiene uno de los peores pronósticos entre los cánceres. El tratamiento puede implicar quimioterapia, radiación y cirugía, solas o en combinación, pero el resultado es todavía generalmente desfavorable para el

paciente. Por ejemplo, la supervivencia media con la radiación de protocolo habitual y quimioterapia con temozolomida es justo de 15 meses. La supervivencia media sin tratamiento es aproximadamente de cuatro meses y medio. Por tanto, queda una necesidad urgente de métodos que aumenten, reemplacen o complementen los métodos actuales de tratamiento de tales cánceres y, en particular, aquellos que presenten respuestas transitorias a quimioterapia. La inmunoterapia ofrece tal procedimiento complementario si se puede evitar la citotoxicidad del quimioagente.

Compendio

El establecimiento de la inmunidad antitumoral mediada por células inmunocompetentes con frecuencia se mitiga por los efectos mielosupresores durante la quimioterapia. La presente descripción proporciona métodos para proteger a estas células inmunes de toxicidades inducidas por fármaco, permitiendo de ese modo la administración combinada de inmuno- y quimioterapia, un tratamiento anticancerígeno denominado "inmunoterapia resistente a fármaco". Usando un sistema de lentivirus basado en VIS, el elemento genético que confiere resistencia a fármaco se puede administrar en las líneas celulares inmunocompetentes. Las células inmunocompetentes genéticamente modificadas desarrollaron resistencia significativa a un agente citotóxico quimioterapéutico específico en comparación con las células no modificadas, y no afectaron a su capacidad de destruir células cancerosas diana en presencia o ausencia de un agente de quimioterapia. Modificar por ingeniería células inmunocompetentes para resistir exposiciones a quimioterapia puede aumentar la muerte de célula tumoral cuando se aplica quimioterapia junto con inmunoterapia basada en célula.

La presente invención se refiere a composiciones aisladas que comprenden linfocitos citolíticos naturales en las que más de aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % de los linfocitos citolíticos naturales expresan un polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia o composiciones aisladas que comprenden linfocitos citolíticos naturales en las que más de aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % de los linfocitos citolíticos naturales comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia o composiciones aisladas que consisten básicamente en linfocitos citolíticos naturales que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia. En realizaciones adicionales, el polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia es O⁶ metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT), una variante resistente a fármaco de dihidrofolato reductasa (L22Y-DHFR), timidilato sintasa, y/o proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR1).

Breve descripción de los dibujos

Muchos aspectos de la descripción se pueden entender mejor en referencia a los siguientes dibujos.

La Figura 1 compara esquemáticamente un protocolo para combinar inmunoterapia y quimioterapia en el tratamiento de un cáncer, en el que las células inmunes son sensibles (arriba) y resistentes (abajo) al agente quimioterapéutico. En el esquema no resistente, se proporciona una respuesta antitumoral por citoquinas tales como IL-2, IL-12, GM-CSF y similares.

Las Figuras 2A y 2B son gráficos que muestran que células $\gamma\delta$ destruyen líneas celulares de glioblastoma de una manera de respuesta a dosis (Fig. 2A), y la capacidad de las células de glioblastoma disminuye con cantidades crecientes de células $\gamma\delta$ (Fig. 2B).

La Figura 2C muestra una serie de imágenes digitales que muestran la muerte de células de glioblastoma.

La Figura 3 muestra un gráfico de barras que ilustra la citotoxicidad de linfocitos T $\gamma\delta$ aislados frente a diversos aislados de célula de glioblastoma cultivada, incluyendo: células de glioblastoma primario cultivadas (GBM1 y GBM2) y las líneas celulares cultivadas D54MG, U251MG, y U373.

La Figura 4 muestra un par de gráficos de barras que ilustran que las células implicadas en la respuesta inmune adaptativa son sensibles a los actuales regímenes de tratamiento de glioblastoma (izquierda). Las células $\gamma\delta$ son igualmente sensibles (derecha).

La Figura 5 es un gráfico que muestra la expresión de antígenos de estrés de superficie celular MICA/B inducida por el agente quimioterapéutico Temozolamida (TMZ).

La Figura 6 es un gráfico que muestra que la expresión de los antígenos de estrés de superficie celular MICA/B inducida por el agente quimioterapéutico Temozolamida (TMZ) es transitoria.

La Figura 7 muestra una serie de imágenes digitales del desarrollo de glioblastomas en ratones inyectados con solución salina (arriba) y linfocitos T $\gamma\delta$ (abajo).

La Figura 8 es un gráfico que muestra la densidad de imagen en ratones 1 a 3 semanas después de la inducción de tumor y el tratamiento con solución salina (círculos negros) o linfocitos T $\gamma\delta$ (círculos claros).

La Figura 9 es un gráfico que muestra la supervivencia incrementada de ratones que tienen glioblastomas inducidos después del tratamiento con linfocito T $\gamma\delta$ (círculos claros).

La Figura 10 compara esquemáticamente un protocolo para combinar inmunoterapia usando linfocitos T $\gamma\delta$ y quimioterapia en el tratamiento de un cáncer, en el que las células inmunes $\gamma\delta$ son sensibles (arriba) y resistentes (abajo) al agente quimioterapéutico.

La Figura 11 es un gráfico que ilustra que la transducción de fibroblastos con una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codificante de MGMT confiere resistencia al compuesto BCNU (bis-cloronitrosourea;

CARMUSTINA™), un compuesto cloro-nitrosoarela relacionado con el gas mostaza usado como un agente alquilantes en quimioterapia, particularmente para el tratamiento de glioblastomas.

La Figura 12 muestra esquemáticamente la región de un lentivirus que incluye dos repeticiones terminales largas (RTL) y una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codificante de una proteína verde fluorescente (GFP) o variante P104K de MGMT.

La Figura 13 es una serie de fotografías digitales que ilustran la transducción de linfocitos T $\gamma\delta$ con construcciones VIS-GFP o VIS-MGMT. Los paneles superiores muestran alta eficacia de transducción usando una construcción codificante de GFP. Tal como se espera, no se observa fluorescencia con MGMT (panel inferior).

La Figura 14 es un gráfico que muestra que la administración de un agente quimioterapéutico a un régimen anticancerígeno, lo cual también requiere expansión del linfocito T, disminuye la eficacia del tratamiento basado en célula. Esta disminución es muy pronunciada cuando los ratones se han sometido a un procedimiento de trasplante de médula ósea, el cual es un procedimiento común para pacientes que se someten a tratamiento para diversos tipos de cáncer.

La Figura 15 muestra esquemáticamente un protocolo experimental para tratar un cáncer con células inmunes resistentes a fármaco. En este protocolo, se extirpó médula ósea de ratones y se sometió a transducción con un vector de lentivirus recombinante que comprendía la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codificante de la variante L22YDHFR. Las células sometidas a transducción se trasplantaron en ratones receptores irradiados. Después de 4 semanas se trasplantaron células de sarcoma AG104. Dos semanas después los ratones recibirían inmunoterapia que comprendía anticuerpos anti-CD137 seguido de quimioterapia (TMTX).

La Figura 16 muestra un par de gráficos que ilustran el efecto del tratamiento con quimioterapia (TMTX) solo o inmunoterapia sola (estimulación del anticuerpo anti-CD137 de linfocitos citotóxicos). En cada caso se siguió el esquema protocolo mostrado en la Fig. 15.

La Figura 17 muestra un gráfico que ilustra la reducción rápida y prolongada en el tamaño del tumor AG104 con la combinación de inmunoterapia-quimioterapia en la que el sistema inmune de los ratones portadores de tumor se vuelve resistente a TMTX mediante la transducción con L22YDHFR.

La Figura 18 muestra una gráfica de supervivencia para ratones portadores de DHFR trasplantados con células del sarcoma AG104 y tratados con TMTX y/o inmunoterapia anti-CD137.

La Figura 19 muestra una gráfica de supervivencia para ratones que reciben esplenocitos aislados de ratones portadores de tumor y curados con DHFR y, a continuación, expuestos a células de sarcoma AG104.

La Figura 20A y la Figura 20B muestran datos que sugieren que linfocitos T $\gamma\delta$ genéticamente modificados destruyeron tanto células GBM resistentes a TMZ como de tipo natural en presencia de agente. Los linfocitos T $\gamma\delta$ no modificados no son activos en presencia de TMZ. En son linfocitos T $\gamma\delta$ gen-modificados. E son linfocitos T $\gamma\delta$ no modificados. D es SB19 resistente a TMZ.

La Figura 21 muestra datos que sugieren que la modificación genética de linfocitos T $\gamma\delta$ confiere resistencia a TMZ. Los linfocitos T $\gamma\delta$ se sometieron a transducción (MDI=20) con VIS-MGMT-DHFR el día 8 de expansión y la viabilidad celular se midió el día 14. La viabilidad se calculó por el consumo de yoduro ToPro.

La Figura 22 muestra datos que sugieren que los linfocitos T $\gamma\delta$ genéticamente modificados conservaron sus citotoxicidades hacia las células GBM. E son linfocitos T $\gamma\delta$ de tipo natural; En son linfocitos T $\gamma\delta$ gen-modificados.

D son líneas celulares SB19 (GBM); (ensayo de citotoxicidad de cuatro horas).

La Figura 23 muestra un modelo molecular de DHFR y las localizaciones de sitios variantes. También se muestra un gráfico que muestra la eficacia de las variantes en conferir resistencia a fármaco a células sometidas a transfección y expresar los polipéptidos variantes.

Las Figuras 24A a 24 D son una serie de gráficos que ilustran la determinación de las eficacias de transducción para células diana inmunocompetentes y experimentales.

La Figura 24A ilustra esquemas de construcciones de vector de VIS codificantes de eGFP (arriba) y P140KMGMT (abajo).

La Figura 24B es una imagen de un análisis de citometría de flujo de células NK-92 sometidas a transducción con lentivirus VIS-eGFP.

La Figura 24C es una imagen de un análisis de citometría de flujo de células TALL-104 sometidas a transducción con lentivirus VIS-eGFP.

La Figura 24D es una imagen de un análisis de citometría de flujo de células K562 sometidas a transducción con lentivirus VIS-eGFP.

La Figura 25A es una serie de gráficos que muestran los análisis de la curva de supervivencia de células NK-92 (panel de la izquierda) modificadas por P140KMGMT (círculos claros) y no modificadas (círculos negros), células TALL-104 (panel en el medio) y células K562 (panel derecho) después del tratamiento con 6-BG/TMZ. Las células se trataron con 6-BG 25 μ M y concentraciones crecientes de TMZ. Cuarenta y ocho horas después, se midieron las viabilidades celulares mediante un método de azul de tripán. Cada punto de datos en todos los gráficos representa la media de los valores por triplicado.

La Figura 25B es un par de gráficos que muestran las actividades citotóxicas de las células NK-92 inmunoefectoras (panel izquierdo) y células TALL-104 (panel derecho) frente a células diana K562 a diferentes relaciones celulares efector:diana (E:D). Las diferentes concentraciones de células modificadas por P140KMGMT (círculos claros), las células gen-modificadas después de la selección con 6-BG 25 μ M/TMZ 200 μ M (triángulo inverso), o células no modificadas (círculos negros) se mezclaron con una concentración fijada de las células

diana y se realizaron ensayos de liberación de LDH después de 4 horas. Cada puto de datos en todos los gráficos representa la media de los valores por triplicado.

La Figura 26 es un par de gráficos que muestran lisis mediada por célula inmunoefectora no modificada por ingeniería de las células K562 diana. Las células efectoras no modificadas (E), y las células K562 diana no modificadas (D) o gen-modificadas (Dm) se trataron con 6-BG 25 μ M/TMZ 200 μ M durante la noche. A continuación, se mezclaron las células efectoras no modificadas (E) con células K562 diana no modificadas (D) o gen-modificadas (Dm) a una relación E:D de 10:1. A continuación, se midieron las actividades citotóxicas de las células efectoras. El Panel A representa lisis mediada por célula NK-92; el Panel B representa lisis mediada por célula TALL-104.

Las Figuras 27A a 27D son una serie de gráficos que ilustran lisis mediada por célula inmunoefectora genéticamente modificada de las células K562 diana en presencia de 6-BG/TMZ. Las células efectoras no modificadas (E) y gen-modificadas (Em), y las células diana no modificadas (D) o gen-modificadas (Dm) se trataron con 6-BG 25 μ M/TMZ 200 μ M durante la noche. Las células efectoras no modificadas o modificadas se incubaron con células diana gen-modificadas a una relación E:D de 10:1, y se midieron las actividades citotóxicas de las células efectoras. Diferentes combinaciones de células efectoras o bien no modificadas o gen-modificadas se mezclaron con células diana o bien no modificadas o gen-modificadas en una relación E:D de 10:1. Se midieron las citotoxicidades de las células efectoras.

La Figura 28 muestra las secuencias de nucleótidos codificantes del codón MGMT y DHFR optimizado para la expresión en células mamíferas.

Descripción detallada

Antes de que la presente descripción se describa a más detalle, hay que entender que esta descripción no está limitada a las realizaciones particulares descritas, ya que, por supuesto, tales pueden variar. También hay que entender que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, puesto que el alcance de la presente descripción estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor que interviene, al decimal de la unidad del límite inferior (a menos que el contexto dicte claramente lo contrario), entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor señalado o que intervenga en ese intervalo señalado, está incluido dentro de la descripción. Los límites superiores e inferiores de estos rangos más pequeños pueden estar incluidos independientemente en los intervalos más pequeños y también están incluidos dentro de la descripción, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo señalado. Cuando el intervalo señalado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen o bien uno o ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la descripción.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Aunque también se pueden usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente descripción, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos.

La citación de cualquier publicación es por su descripción previa de la fecha de presentación y no se debería construir como una admisión de que la presente descripción no tiene derecho a preceder tal publicación en virtud de la descripción anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas podrían ser diferentes de las fechas reales de publicación que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

Como será aparente para los expertos en la técnica tras la lectura de la descripción, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene componentes y características distintas que fácilmente se pueden separar de o combinar con las características de cualquiera de las otras diversas realizaciones sin apartarse del alcance o espíritu de la presente descripción. Cualquier método citado se puede llevar a cabo en el orden de sucesos citados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Las realizaciones de la presente descripción emplearán, a menos que se indique lo contrario, técnicas de química, química orgánica sintética, bioquímica, biología, biología molecular, realización de imagen molecular y similares, que están dentro de las técnicas de la técnica. Tales técnicas están completamente explicadas en la bibliografía.

Los siguientes ejemplos se sugieren para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa y descripción de cómo realizar los métodos y el uso de las composiciones y compuestos descritos y reivindicados en el presente documento. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero algunos errores y desviaciones se deberían tomar en cuenta. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura está en $^{\circ}$ C, y la presión está en o cerca de la atmosférica. La temperatura y la presión patrón se definen como 20 $^{\circ}$ C y 1 atmósfera.

Antes de que de las realizaciones de la presente descripción se describan en detalle, hay que entender que, a menos que se indique lo contrario, la presente descripción no se limita a materiales, reactivos, materiales de reacción, procesos de fabricación particulares, o similares, ya que tales pueden variar. También hay que entender que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante. También es posible en la presente descripción que las etapas se puedan ejecutar en diferente secuencia en la que esto es lógicamente posible.

Se debe indicar que, tal como se usa en la memoria y las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, referencia a “un soporte” incluye una pluralidad de soportes. En esta memoria y en las reivindicaciones que siguen, la referencia se hará a un número de términos que se definirán para tener los siguientes significados a menos que una intención contraria sea aparente.

Definiciones

En la descripción y reivindicación del asunto a tratar descrito, se usará la siguiente terminología usada según las definiciones explicadas más adelante.

Por “administración” se quiere decir introducir un compuesto, materiales biológicos que incluyen una población celular, o una combinación de los mismos, de la presente descripción en un sujeto humano o animal. La vía preferida de administración de los compuestos es intravenosa. Sin embargo, se pueden usar cualquier vía de administración, tal como oral, tópica, subcutánea, peritoneal, intraarterial, inhalación, vaginal, rectal, nasal, introducción dentro del fluido cerebroespinal, o instilación dentro de los compartimentos corporales. También se contempla la inyección directa en un sitio tisular diana tal como un tumor sólido.

Los términos “agente terapéutico”, “agente quimioterapéutico” o “fármaco” como se usan en el presente documento se refieren a un compuesto o un derivado del mismo que puede interactuar con una célula cancerosa, reduciendo de ese modo el estado proliferativo de la célula y/o destruyendo la célula. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosamida), antagonistas metabólicos (por ejemplo, metotrexato (MTX), 5-fluorouracilo o derivados de los mismos), antibióticos antitumorales (por ejemplo, mitomicina, adriamicina), agentes antitumorales derivados de plantas (por ejemplo, vincristina, vindesina, Tasol), cisplatina, carboplatino, etopósido y similares. Tales agentes además pueden incluir, pero no se limitan a, los agentes anticancerosos TRIMETOTRIXATO™ (TMTX), TEMOZOLOMIDA™, RALTRITREXED™, S-(4-nitrobencil)-6-tioinosina (NBMPR), 6-bencilguanidina (6-BG), bis-cloronitrosourea (BCNU) y CAMPTOTECINA™, o un derivado terapéutico de cualquiera de los mismos.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en el presente documento se refiere a esa cantidad del compuesto a administrar que aliviará hasta cierto punto uno o más de los síntomas de una enfermedad, una afección, o un trastorno a tratar. En referencia a cáncer o patologías relacionadas con la división celular no regulada, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a esa cantidad que tiene el efecto de (1) reducir el tamaño de un tumor, (2) inhibir (es decir, retrasar hasta cierto punto, preferentemente parar) la división celular aberrante, por ejemplo, la división celular cancerosa, (3) prevenir o reducir la metástasis de células cancerosas, y/o, (4) aliviar hasta cierto punto (o, preferentemente, eliminar) uno o más síntomas asociados con una patología relacionada con o causada en parte por división celular no regulada o aberrante, incluyendo, por ejemplo, cáncer o angiogénesis.

Los términos “tratar” o “tratamiento” de una enfermedad (o una afección o un trastorno) como se usan en el presente documento se refiere a evitar que la enfermedad se dé en un animal que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no experimenta ni presenta síntomas de la enfermedad (tratamiento profiláctico), inhibir la enfermedad (retrasar o parar su desarrollo), proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo tratamiento paliativo), y aliviar la enfermedad (causando regresión de la enfermedad). Con respecto al cáncer, estos términos también significan que se puede incrementar la expectativa de vida de un individuo afectado con un cáncer o que se reducirán uno o más de los síntomas de la enfermedad.

Los términos “sujeto” y “paciente” como se usa en el presente documento incluyen humanos, mamíferos (por ejemplo, gatos, perros, caballos, etc.), células vivas y otros organismos vivos. Un organismo vivo puede ser tan sencillo como, por ejemplo, un eucariota unicelular o tan complejo como un mamífero. Los hospedadores normales a los cuales se pueden administrar las realizaciones de la presente descripción serán mamíferos, particularmente primates, especialmente humanos. Para aplicaciones veterinarias, será adecuada una amplia diversidad de sujetos, por ejemplo, ganado tal como reses, ovejas, cabras, vacas, puercos y similares; aves de corral tales como pollos, patos, gansos, pavos y similares; y animales domesticados particularmente mascotas tales como perros y gatos. Para aplicaciones de diagnóstico o investigación, una amplia diversidad de mamíferos serán sujetos adecuados, incluyendo roedores (por ejemplo, ratas, ratones, hámsteres), conejos, primates y puercos tales como cerdos endogámicos y similares. En algunas realizaciones, un sistema incluye una muestra y un sujeto. El término “hospedador vivo” se refiere a que el hospedador o los organismos anteriormente indicados están vivos y no están muertos. El término “hospedador vivo” se refiere al hospedador u organismo entero y no justo a una parte extirpada (por ejemplo, un hígado u otro órgano) del hospedador vivo.

El término “linfocitos T $\gamma\delta$ (linfocitos T gama delta)” como se usa en el presente documento se refiere a un pequeño subconjunto de linfocitos T que se pueden unir específicamente a receptor de linfocito T (RLT) diferente o su superficie. Una mayoría de linfocitos T tienen un RLT compuesto de dos cadenas de glicoproteína denominadas cadenas α - y β de RLT. Por el contrario, en linfocitos T $\gamma\delta$, el RLT está compuesto de una cadena γ y una cadena δ . Este grupo de linfocitos T normalmente es mucho menos común que los linfocitos T $\alpha\beta$, pero se encuentran en su mayor abundancia en la mucosa de la barriga, dentro de una población de linfocitos conocidos como linfocitos intraepiteliales (LIE).

Las moléculas antigénicas que activan los linfocitos T $\gamma\delta$ son aun en gran parte desconocidas. Sin embargo, los linfocitos T $\gamma\delta$ son peculiares en que no parecen requerir procesamiento de antígeno y presentación de MHC de epítomos peptídicos aunque alguno reconozca las moléculas MHC de clase IB. Además, se cree que los linfocitos T $\gamma\delta$ tienen un papel destacado en el reconocimiento de antígenos lipídicos, y responden a antígenos relacionados con el estrés tal como MIC-A y MIC-B.

El término “cáncer”, como se usa en el presente documento, se le dará su significado normal, como un término general para enfermedades en las que las células anormales se dividen sin control. En particular, y en el contexto de las realizaciones de la presente descripción, el cáncer se refiere a cáncer relacionado con angiogénesis. Las células cancerosas pueden invadir tejidos cercanos y pueden propagarse por la corriente sanguínea y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Hay varios tipos principales de cáncer, por ejemplo, el carcinoma es cáncer que comienza en la piel o en los tejidos que cubre o reviste órganos internos. El sarcoma es cáncer que comienza en los huesos, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conectivo o de soporte. La leucemia es cáncer que comienza en el tejido formador de sangre tal como la médula ósea, y provoca que se produzcan grandes números de células sanguíneas anormales y entren en la corriente sanguínea. El linfoma es cáncer que comienza en las células del sistema inmune.

Cuando las células normales pierden su capacidad de comportarse como una unidad especificada, controlada y coordinada, se forma un tumor. Generalmente, un tumor sólido es una masa anormal de tejido que normalmente no contiene áreas de quistes o líquido (algunos tumores cerebrales tienen quistes y áreas necróticas centrales rellenas con líquido). Un tumor sencillo puede tener incluso diferentes poblaciones de células dentro de él, con procesos de diferenciación que han fracasado. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerosos), o malignos (cancerosos). Los diferentes tipos de tumores sólidos se denominan por el tipo de células que los forman. Son ejemplos de tumores sólidos los sarcomas, los carcinomas y los linfomas. Las leucemias (cánceres de la sangre) generalmente no forman tumores sólidos.

Cánceres representativos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer de pulmón de no célula pequeña, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de tiroides, cáncer gástrico, glioma del tallo cerebral, astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral, glioblastoma, ependimoma, familia de tumores del sarcoma de Ewing, tumor de la célula germinal, cáncer extracraneal, enfermedad de Hodgkin, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, cáncer de hígado, meduloblastoma, neuroblastoma, tumores cerebrales generalmente, linfoma no Hodgkin, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno de hueso, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcomas de tejido blando generalmente, tumores pineales y neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de la vía visual e hipotalámico, tumor de Wilms, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda de adulto, linfoma no Hodgkin de adulto, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cáncer esofágico, leucemia de célula vellosa, cáncer de riñón, mieloma múltiple, cáncer oral, cáncer pancreático, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de piel, cáncer de pulmón de célula pequeña, entre otros.

Un tumor se puede clasificar como maligno o benigno. En ambos casos, hay una agregación y proliferación anormal de células. En el caso de un tumor maligno, estas células se comportan más agresivamente, adquiriendo propiedades de invasividad incrementada. Finalmente, las células tumorales pueden incluso ganar la capacidad de separarse del ambiente microscópico en el cual se originan, de propagarse a otra área del cuerpo (con un ambiente muy diferente, no normalmente conducente a su crecimiento), y continuar su rápido crecimiento y división en esta nueva localización. Esto se denomina metástasis. Una vez que las células malignas hayan sufrido metástasis, conseguir una cura es muy difícil. Los tumores benignos tienen menos tendencia a invadir y son menos probables de sufrir metástasis.

Los tumores cerebrales se propagan ampliamente dentro del cerebro, pero normalmente no sufren metástasis fuera del cerebro. Los gliomas son muy invasivos dentro del cerebro, incluso cruzan los hemisferios. Aunque, no se dividen de una manera descontrolada. Dependiendo de su localización, pueden ser justo tan potencialmente mortales como las lesiones malignas. Un ejemplo de esto sería un tumor benigno en el cerebro, el cual puede crecer y ocupar espacio dentro del cráneo, llevando a presión incrementada sobre el cerebro.

El término “reducir un cáncer” como se usa en el presente documento se refiere a una reducción en el tamaño o volumen de una masa tumoral, un descenso en el número de tumores que sufren metástasis en un sujeto, un

descenso en el estado proliferativo (el grado al cual las células cancerosas se multiplican) de las células cancerosas, y similares.

5 Los términos “aislado y población aislada de células” como se usan en el presente documento se refieren a una célula o una pluralidad de células extraídas del tejido o el estado en el cual se encuentran en un sujeto. Los términos además pueden incluir células que se han separado según tales parámetros como, pero no se limitan a, marcadores de superficie celular, un marcador indicador tal como un colorante o etiqueta.

10 El término “expresado” o “expresión” como se usa en el presente documento se refiere a la transcripción a partir de un gen para dar una molécula de ácidos nucleicos de ARN al menos complementaria en parte a una región de una de las dos cadenas de ácidos nucleicos del gen. El término “expresado” o “expresión” como se usa en el presente documento también se refiere a la traducción a partir de dicha molécula de ácidos nucleicos de ARN para dar una proteína, un polipéptido, o una porción o fragmento del mismo.

15 El término “promotor” como se usa en el presente documento se refiere a la secuencia de ADN que determina el sitio de la iniciación de la transcripción a partir de una ARN polimerasa. Un “elemento proximal promotor” puede ser una secuencia reguladora dentro de aproximadamente 200 pares de bases del sitio de inicio de transcripción.

20 El término “célula recombinante” se refiere a una célula que tiene una nueva combinación de segmentos de ácidos nucleicos que no están unidos covalentemente uno a otros en la naturaleza. Una nueva combinación de segmentos de ácidos nucleicos se puede introducir dentro de un organismo usando una amplia colección de técnicas de manipulación de ácidos nucleicos disponibles a los expertos en la técnica. Una célula recombinante puede ser un eucariota unicelular, o un procariota unicelular, o una célula de mamífero. La célula recombinante puede albergar un vector que es extragenómico. Un vector de ácidos nucleicos extragenómico no se inserta dentro del genoma de la
25 célula. Una célula recombinante además puede albergar un vector o una porción del mismo que es intragenómico. El término “intragenómico” define una construcción de ácidos nucleicos incorporada dentro del genoma de la célula recombinante.

30 Los términos “ácido nucleico recombinante” y “ADN recombinante” como se usan en el presente documento se refieren a combinaciones de al menos dos secuencias de ácidos nucleicos que no se encuentran de manera natural en una célula eucariota o procariota. Las secuencias de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, vectores de ácidos nucleicos, elementos reguladores de la expresión génica, orígenes de replicación, secuencias génicas adecuadas que cuando se expresan confieren resistencia a antibiótico, secuencias codificantes de proteína y similares. El término “polipéptido recombinante” quiere decir que incluye un polipéptido producido por técnicas de
35 ADN recombinante de modo que es diferente de un polipéptido de origen natural o bien en su localización, pureza o estructura. Generalmente, tal polipéptido recombinante estará presente en una célula en una cantidad diferente de la normalmente observada en la naturaleza.

40 Los términos “de manera operable” o “unido de manera operable” como se usan en el presente documento se refieren a la configuración de las secuencias codificantes y control para realizar la función deseada. Por tanto, las secuencias control unidas de manera operable a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Una secuencia codificante se une de manera operable a o bajo el control de las regiones reguladoras transcripcionales en una célula cuando la ADN polimerasa unirá la secuencia promotora y transcribirá la secuencia codificante dentro del ARNm que se puede traducir a la proteína codificada. Las secuencias control no
45 necesitan ser contiguas con la secuencia codificante, siempre que funcionen para dirigir su expresión. Por tanto, por ejemplo, secuencias transcritas no traducidas aún intermedias pueden estar presentes entre una secuencia promotor y la secuencia codificante y la secuencia promotor puede aún considerarse “unida de manera operable” a la secuencia codificante.

50 Los términos “heterólogos” y “exógenos” cuando se refieren a secuencias de ácidos nucleicos tales como secuencias codificantes y secuencias control, indican secuencias que no están normalmente asociadas a una región de una construcción recombinante o a un locus cromosómico particular, y/o no están normalmente asociadas a una célula particular. Por tanto, una región “heteróloga” de una construcción de ácidos nucleicos es un segmento identificable de ácidos nucleicos dentro o unido a otra molécula de ácidos nucleicos que se encuentra en asociación
55 con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de una punta de construcción podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias no encontradas en asociación con la secuencia codificante en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es una construcción en la que la propia secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). Igualmente, una célula hospedadora transformada con una construcción que no está normalmente presente en la célula hospedadora se consideraría heteróloga para los fines de esta invención.
60

En algunas realizaciones el promotor se modificará mediante la adición o delección de secuencias, o se reemplazará con secuencias alternativas, incluyendo secuencias naturales y sintéticas así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Muchos promotores eucariotas contienen dos tipos de secuencias
65 de reconocimiento: la caja TATA y los elementos promotores en dirección 5' (*upstream*). El primero, localizado en dirección 5' del sitio de iniciación de transcripción, está implicado en dirigir la ARN polimerasa para iniciar la

transcripción en el sitio correcto, mientras que lo último parece determinar la tasa de transcripción y está en dirección 5' de la caja TATA. Los elementos potenciadores también pueden estimular la transcripción de promotores unidos, pero muchos funcionan exclusivamente en un tipo particular de célula. Muchos elementos potenciadores/promotores derivados de virus, por ejemplo, el SV40, el virus del sarcoma de Rous (VSR), y promotores de CMV son activos en una amplia colección de tipos celulares, y se denominan "constitutivos" o "ubícuos". La secuencia de ácidos nucleicos insertada en el sitio de clonación puede tener cualquier marco de lectura abierto codificante de un polipéptido de interés, con la condición de que donde la secuencia codificante codifica un polipéptido de interés, debería carecer de sitios de ajuste (*splice*) que puedan bloquear la producción de moléculas de ARNm apropiadas y/o producir moléculas de ARNm sometidas de manera aberrante a ajuste o anormales.

La región de terminación que se emplea principalmente será una de conveniencia, puesto que las regiones de terminación parecen ser relativamente intercambiables. La región de terminación puede ser nativa a la secuencia de ácidos nucleicos prevista de interés, o se puede derivar de otra fuente.

El término "vector" como se usa en el presente documento se refiere a un polinucleótido comprendido de ADN de cadena sencilla, doble cadena, circular o superenrollado o ARN. Un vector normal puede estar comprendido de los siguientes elementos unidos de manera operativa a distancias apropiadas para permitir la expresión del gen funcional: origen de replicación, promotor, potenciador, secuencia líder de ARNm 5', sitio de unión ribosómico, casete de ácido nucleico, terminación y sitios de poliadenilación, y secuencias marcadoras seleccionables. Uno o más de estos elementos se pueden omitir en aplicaciones específicas. El casete de ácido nucleico puede incluir un sitio de restricción para la inserción de la secuencia de ácidos nucleicos a expresar. En un vector funcional el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de ácidos nucleicos a expresar incluyendo los sitios de iniciación y terminación de traducción.

Un vector se construye de manera que la secuencia codificante particular esté localizada en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, la posición y la orientación de la secuencia codificante con respecto a las secuencias control que son de tal modo que la secuencia codificante se transcribe bajo el "control" de las secuencias control o reguladoras. La modificación de las secuencias codificantes de la proteína particular de interés puede ser deseable para alcanzar este fin. Por ejemplo, en algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de manera que se pueda unir a las secuencias control con la orientación apropiada; o mantener el marco de lectura. Las secuencias control y otras secuencias reguladoras pueden estar ligadas a la secuencia codificante antes de la inserción en el vector. Alternativamente, la secuencia codificante se puede clonar directamente en un vector de expresión que contiene ya las secuencias control y un sitio de restricción apropiado que está en el marco de lectura con y bajo control regulador de las secuencias control.

El término "vector basado en lentivirus" como se usa en el presente documento se refiere a un vector de lentivirus diseñado para insertar de manera operable una secuencia de polinucleótido exógena dentro de un genoma hospedador de una manera específica a sitio. Los vectores guías basados en lentivirus pueden estar basados en, pero no se limitan a, por ejemplo, VIH-1, VIH-2, virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS), o virus de la inmunodeficiencia felina (VIF). En una realización preferida, el vector guía basado en lentivirus es un vector guía basado en VIH. Este vector puede comprender toda o una parte de la secuencia de polinucleótidos de VIH.

Los términos "transformación", "transducción" y "transducción" todos indican la introducción de un polinucleótido dentro de una célula o células receptoras

Análisis

Una limitación muy importante a los tratamientos con quimioterapia para el cáncer es la inmunotoxicidad inducida por fármaco. Esto da como resultado, tras la administración del agente terapéutico, la muerte de células inmunocompetentes y la pérdida de un sistema inmune eficaz que de lo contrario protegería de infecciones indeseables o proporcionaría una defensa frente a células cancerosas. Una estrategia para combatir los efectos tóxicos graves de la quimioterapia es modificar genéticamente células sanguíneas o de médula mediante la introducción de vectores retrovirales diseñados para expresar las secuencias de ADNc que confieren resistencia a fármaco. La introducción de genes resistentes a fármaco dentro de células madre hematopoyéticas (CMH) da como resultado la expresión transgénica por todo el sistema hematopoyético hospedador, incluyendo células inmunocompetentes tales como linfocitos T y linfocitos citotóxicos naturales, después del trasplante de células genmodificadas de vuelta dentro de un paciente receptor, como se describe por McMillin y col., (2006) *Human Gene Therapy* 17:798-806. Entonces, el paciente puede desarrollar un sistema inmune activo mientras que a la vez se somete a quimioterapia. Sin embargo, en el caso de la expresión transgénica de CMH, conforme pasa el tiempo no todos los linfocitos T y linfocitos citotóxicos naturales en el sujeto expresan el gen resistente a fármaco. Por ejemplo, McMillin y col. (2005) describe que menos del 50 % de las células NK contenían un marcador de expresión 8 semanas después del trasplante. Véase la Figura 3 de McMillin y col.

Una estrategia alternativa sería modificar genéticamente de manera selectiva células inmunocompetentes citotóxicas que pueden dirigir activamente aquellas células cancerosas capaces de resistir la administración simultánea de un

agente quimioterapéutico, eliminando de ese modo eficazmente la mayoría si no todas las células cancerosas del paciente.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a composiciones aisladas que comprenden linfocitos citolíticos naturales en las que más de aproximadamente el 50 % de los linfocitos citolíticos naturales expresan un polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia. En otras realizaciones, la invención se refiere a composiciones aisladas que comprenden linfocitos T citolíticos naturales en las que más de aproximadamente el 50 % de los linfocitos T citolíticos naturales comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia. En otra realización la invención se refiere a composiciones aisladas que consisten básicamente en linfocitos T citolíticos naturales que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia. En ciertas realizaciones el polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia es O⁶ metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT), una variante resistente de dihidrofolato reductasa (L22Y-DHFR), timidilato sintasa, proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR1).

En el presente documento también se describe métodos de tratamiento de un sujeto diagnosticado con cáncer que comprende: administrar un agente de quimioterapia al sujeto y administrar una composición de linfocito citolítico natural resistente a quimioterapia al sujeto en el que la composición de linfocito citolítico natural resistente a quimioterapia comprende linfocitos citolíticos naturales genéticamente modificadas para expresar un polipéptido que confiere resistencia al agente de quimioterapia.

La presente descripción incluye métodos por los cuales se protegen selectivamente a las células inmunocompetentes de los efectos tóxicos de la quimioterapia, permitiendo de ese modo la administración conjunta de quimioterapia e inmunoterapia basada en célula y, por lo tanto, denominada inmunoterapia resistente a fármaco. Se ha mostrado la viabilidad de usar inmunoterapia resistente a fármaco en el contexto de células hematopoyéticas resistentes a fármaco (Cesano y col., (1998) *Anticancer Res.* 18:2.289-2.295). Se modificaron genéticamente células de médula ósea de ratón mediante la introducción mediada por retrovirus de un ADNc codificante de una forma mutante de DHFR, es decir, L22Y-DHFR que confiere resistencia a trimetrexato (TMTX). Los ratones se trasplantaron con células de médula ósea gen-modificadas que dieron como resultado la expresión transgénica en todos los linajes hematopoyéticos. A continuación, los ratones se trataron con el agente inmunoterapéutico anti-CD137, TMTX solo, o una combinación de anti-CD137 y TMTX.

En ratones inoculados con células del sarcoma AG104, la quimioterapia con TMTX redujo la eficacia de un anticuerpo anti-CD137 en ratones trasplantados con células no modificadas que eran sensibles al TMTX. Sin embargo, cuando los ratones se protegieron frente a toxicidad inducida por quimioterapia por el trasplante de médula ósea que expresa L22Y-DHFR, el tratamiento combinado con TMTX y anti-CD137 dio como resultado erradicación completa de tumores en el 100 % de animales. La presente descripción proporciona evidencia de que las células inmunocompetentes humanas genéticamente modificadas se pueden usar en el contexto de inmunoterapia de resistencia a fármaco, más que modificar genéticamente el sistema hematopoyético entero. La capacidad de proporcionar a un paciente una población genéticamente modificada de células inmunocompetentes citotóxicas, y en particular si se administra localmente al sitio de un tumor, permitiría la inmunoterapia junto con quimioterapia sin someterse necesariamente a trasplante de médula ósea.

Las células NK-92 y TALL-104 son líneas celulares inmunoelectoras representativas ya que ambos de estos tipos celulares reconocen y destruyen una amplia serie de células malignas, incluyendo células K562 (Sawai y col., (2001) *Mol. Ther.* 3:78-87; Tam y col., (1999) *J. Hematother.* 8:281-290). La línea de célula NK humana citotóxica altamente potente NK-92 es una línea de linfocito citolítico natural humano dependiente de interleuquina 2 (IL-2) con características funcionales y fenotípicas de células NK activadas (Gong y col., (1994) *Leukemia* 8:652-658). Las células NK-92 son efectores del sistema inmune innato, el cual juega un importante papel en las respuestas del hospedador frente a virus y células tumorales. Debido a la alta citotoxicidad frente a un amplio espectro de células tumorales primarias y establecidas a bajas relaciones efector: diana y frente a leucemia primaria en ratones SCID (Gong y col., (1994) *Leukemia* 8:652-658; Yan y col., (1998) *Clin. Cancer Res.* 4:2.859-2.868; Tam y col., (1999) *J. Hematother.* 8:281-290) las hace un candidato razonable como célula inmunoelectora resistente a fármaco (Yan y col., (1998) *Clin. Cancer Res.* 4:2.859-2.868; Tam y col., (1999) *J. Hematother.* 8:281-290). Las células TALL-104 son una línea de linfocito T leucémica dependiente de interleuquina 2 que tiene marcadores de superficie normales a los encontrados sobre tanto linfocitos T citotóxicos como linfocitos citolíticos naturales. Las células TALL-104 lisan las células tumorales de una manera no restringida a HLA (Tam y col., (1999) *J. Hematother.* 8:281-290). La inmunoterapia adoptiva con TALL-104 ha inducido remisiones completas o parciales a largo plazo en animales portadores de tumor (Tam y col., (1999) *J. Hematother.* 8:281-290; Geoerger y col., (2000) *Neuro Oncol.* 2:103-113). Igual que las células NK-92, usamos células TALL-104 como células inmunocompetentes para nuestros estudios de prueba de concepto puesto que estas células se pueden desarrollar en cultivo indefinidamente para proporcionar una fuente ilimitada de células efectoras con actividad tumoricida estable.

Las células NK-92 y TALL-104 genéticamente modificadas por P104K-MGMT eran resistentes a TMZ y tenían actividades citotóxicas similares a las células no modificadas. Además, las células gen-modificadas mostraron

actividades citolíticas similares a células no sometidas a transducción después de la selección del fármaco. Por lo tanto, la modificación genética de estas células no afecta a su actividad citotóxica.

Se evaluó la inmunoterapia resistente a fármaco en una serie de ensayos citotóxicos, en presencia y ausencia de un fármaco citotóxico. Dasgupta y col., (2010) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 391:170-175. De manera importante, las células inmunocompetentes gen-modificadas mostraron actividades citolíticas significativas hacia células tumorales resistentes a fármaco en presencia de fármaco. Por el contrario, las células inmunocompetentes no modificadas eran ineficaces en muerte tumoral cuando se administraba fármaco. Combinados, estos resultados demuestran que, en presencia de un fármaco quimioterapéutico citotóxico, las células efectoras gen-modificadas siguen activas, y se observó un mayor nivel de muerte de célula cancerosa diana después de tratar con células efectoras gen-modificadas y células diana no modificadas en comparación con células efectoras no modificadas y células diana resistentes a fármaco. Por consiguiente, las células inmunocompetentes resistentes a fármaco genéticamente modificadas se podrían modificar por ingeniería para sobrevivir a los efectos citotóxicos de agentes quimioterapéuticos y la eficacia de muerte tumoral incrementa significativamente durante una exposición a quimioterapia.

La presente descripción proporciona datos de que las células efectoras inmunocompetentes resistentes a fármaco son efectores citotóxicos superiores durante una exposición a quimioterapia. Esto es un descubrimiento significativo que se puede combinar con actuales inmunoterapias basadas en célula y adoptivas. Se ha mostrado que la regresión de tumores vascularizados grandes se da en pacientes con melanoma metastásico refractario. Sin embargo, para máxima eficacia, generalmente es necesario un régimen de linfo-disminución antes de la transferencia de linfocito autólogo (Chinnasamy y col., (2004) *Hum. Gene Ther.* 8:758-769).

La generación y expansión de linfocitos resistentes a fármaco (en lugar del sistema hematopoyético entero) *ex vivo* puede permitir, en este marco, la administración de terapia basada en célula inmunocompetente concurrentemente con la quimioterapia, mejorando potencialmente la eliminación del tumor mientras se establece y se mantiene la inmunidad antitumoral. En este escenario, se pueden mermar los linfocitos no sometidos a transducción usando un tratamiento con quimioterapia selectiva, la cual se podría aplicar continuamente durante la administración de inmunoterapia adoptiva. La administración conjunta de quimio- e inmunoterapias, a continuación, conducirían a la eliminación del tumor a largo plazo.

Sin embargo, se demostró que el crecimiento de células de LMC en ratones trasplantados con médula ósea modificada por ingeniería para conferir resistencia a MTX se puede exacerbar mediante la administración de quimioterapia (Rosenberg & Dudley (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:14.639-14.645). Por tanto, el tratamiento con quimioterapia en el contexto de la protección de médula ósea completa gen-modifica puede inducir efectos secundarios tales como inmunosupresión que permite a algunos cánceres sobrevivir a una exposición a fármaco. Sin embargo, basándose en los resultados de la presente descripción en lugar de trasplantar células madre hematopoyéticas resistentes a fármaco, una estrategia más eficaz implica el trasplante de linfocitos inmunocompetentes resistentes a fármaco.

Además, recientemente se mostró que las líneas celulares de melanoma y glioma son sensibles a la combinación de TMZ y antifolatos (Sweeney y col., (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300:1.075-1.084). Por lo tanto, en una realización de los métodos de la descripción, la transferencia retroviral de vectores dobles que expresan conjuntamente variantes de DHFR resistentes a fármaco, tales como, L22Y-DHFR, junto con P140-MGMT incrementaría la muerte de célula tumoral permitiendo la inmunoterapia citotóxica eficaz mientras que se administra una combinación de agentes quimioterapéuticos. La expresión de mutantes DHFR, por ejemplo, puede proporcionar resistencia a antifolatos tales como metotrexato y trimetrexato, mientras que la expresión de MGMT puede proporcionar resistencia a agentes de metilación monofuncionales tales como dacarbazina y procarbazona así como agentes de cloroetilación bifuncionales tales como BCNU, ACNU o TMZ.

Por consiguiente, se realizó una serie de ensayos citotóxicos combinatorios con células diana y efectoras no modificadas y gen-modificadas. Para determinar los efectos de TMZ sobre células no modificadas, se realizaron ensayos de citotoxicidad por los que se mezclaron las células efectoras no modificadas con células diana gen-modificadas en o bien ausencia o presencia de 6-BG 200 µM/TMZ.

Se usaron células gen-modificadas para eliminar los efectos de la quimioterapia sobre las células diana (las células diana gen-modificadas eran resistentes a TMZ a esta concentración de fármaco). Antes de que se iniciaran estos estudios, se determinó la sensibilidad de las células K562 gen-modificadas a células NK-92 y TALL-104. Se condujo un ensayo de citotoxicidad de 4 horas en el que las células efectoras no modificadas (E) se incubaron con o bien células diana no modificadas (D) o diana gen-modificadas (Dm) en una relación de efector y diana de 10:1, como se muestra en la Fig. 27, en ausencia de fármaco. Las citotoxicidades de ambas líneas celulares efectoras no modificadas (NK92 y TALL-104) hacia o bien células diana no modificadas o gen-modificadas eran comparables ($P_{NK-92}=0,8441$, $P_{TALL-014}=0,6349$). Por tanto, la modificación genética de las células diana no afectó a su lisis por las células inmunocompetentes.

A continuación, se condujeron ensayos citotóxicos usando células efectoras no modificadas y células diana gen-modificadas en presencia de TMZ. Se observó un descenso significativo en la lisis mediada tanto por célula NK-92 como TALL-104 cuando se comparó con las células diana gen-modificadas en ausencia de tratamiento con fármaco (véase la Fig. 27; $P_{NK-92}=0,0003$, $P_{TALL-014}=0,0008$). Por tanto, la eliminación de células tumorales resistentes a fármaco mediante células inmunocompetentes no modificadas está limitada seriamente después de una exposición a quimioterapia.

Para comparar la eficacia asesina de las células inmunoefectoras no modificadas y gen-modificadas durante los tratamientos con fármaco, se condujeron ensayos de citotoxicidad por los que se incubaron células efectoras no modificadas o modificadas por P140KMGM (Em) con células diana gen-modificadas (Dm) y 6-BG 200 μ M/TMZ.

Cuando se compararon con células efectoras no modificadas, las células NK-92 genéticamente modificadas lisaron células diana significativamente mejor después de ser tratadas con 6-BG/TMZ, como se muestra en la Fig. 28A ($P_{NK-92}=0,0001$). Por tanto, en presencia de fármaco, las células inmunocompetentes modificadas por P140KMGM eran activas destruyendo células tumorales. En condiciones idénticas, sin embargo, las células TALL-104 genéticamente modificadas tenían solamente un incremento modesto en la actividad citotóxica. (Fig. 28B).

Para determinar la eficacia de las células tumorales resistentes a fármaco durante una exposición a quimioterapia cuando las células diana son sensibles al tratamiento con fármaco, efectores gen-modificados, es decir, células P140KMGM-TALL-104 y P140KMGM-TALL-104, se incubaron con células diana sensibles a fármaco no modificadas y 6-BG 200 μ M/TMZ. A continuación, se compararon las citotoxicidades de estas células inmunocompetentes resistentes a fármaco con las citotoxicidades alcanzadas usando células inmunocompetentes sensibles a fármaco, como se muestra en las Fig. 28C y 28D.

En comparación con la muerte de células diana gen-modificadas por células efectoras no modificadas, había un incremento significativo de aproximadamente 4,5 veces y 2,5 veces la muerte de células diana no modificadas por las células NK-92 y TALL-104 genéticamente modificadas, respectivamente ($P_{NK-92}=0,0012$, $P_{TALL-014}=0,0011$). Estos datos demuestran que las células NK-92 y TALL-104 modificadas por P140KMGM funcionan como efectores potentes en presencia de 6-BG/TMZ, y que las células inmunocompetentes resistentes a fármaco, cuando se usan concurrentemente con quimioterapia, pueden aumentar significativamente la muerte de células diana.

Realizaciones de la presente descripción incluyen métodos de tratamiento de cánceres, y en particular tumores cancerosos. Los métodos de la descripción combinan el uso de agentes quimioterapéuticos que pueden destruir o reducir la proliferación de células cancerosas, con inmunoterapia para eliminar eficazmente aquellas células cancerosas que desarrollan resistencia a fármaco o si no escapan del agente quimioterapéutico. Los métodos de la presente descripción proporcionan aislamiento de células inmunes citotóxicas, que incluyen, pero no se limitan a, linfocitos T $\gamma\delta$ o bien de un paciente a tratar o de otra fuente, como se describe, por ejemplo, por Lamb L.S. en el documento de Patente americana N° de serie 7.078.034. A continuación, las células aisladas se pueden someter a transfección con un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga codificante de un polipéptido que confiere a la célula resistencia a un agente quimioterapéutico seleccionado. A continuación, el paciente en necesidad de tratamiento para un cáncer, y en particular un tumor, puede recibir una dosis, o dosis, de los linfocitos T sometidos a transfección antes, después o con el agente quimioterapéutico. El propio agente, aunque se pretende que sea tóxico a las células cancerosas dirigidas, y reducirá la proliferación y viabilidad de las células, también puede inducir la formación sobre la superficie celular de las células cancerosas de proteínas relacionadas con el estrés. Los linfocitos T $\gamma\delta$ sometidos a transfección, por ejemplo, tienen la característica de ser capaces de reconocer y, por lo tanto, dirigir tales ligandos relacionados con el estrés, dirigiendo específicamente o preferentemente de ese modo las células cancerosas.

La transducción de una población de células inmunes citotóxicas, tales como linfocitos T $\gamma\delta$ con un ácido nucleico heterólogo codificante de un polipéptido exógeno que confiere resistencia al agente quimioterapéutico puede asegurar que las células inmunoterapéuticas no estén negativamente afectadas por el agente (fármaco). El resultado es que la quimioterapia y la inmunoterapia cooperan para reducir eficazmente la masa tumoral o eliminar las células cancerosas. Los datos proporcionados en el presente documento indican que se puede conseguir un incremento en el resultado de supervivencia de un animal tratado.

Se contempla que las células inmunes citotóxicas genéticamente modificadas tales como los linfocitos T $\gamma\delta$ se pueden administrar a tumor dirigido directamente mediante tal como, pero no se limita a, inyección directa en la masa tumoral, administración a un vaso sanguíneo que entra en la masa tumoral, o una combinación de ambos. Por ejemplo, se contempla que las células se pueden administrar a una masa de glioblastoma en el cerebro de un paciente por implantación directa a través de una aguja canulada en la masa tumoral.

Los métodos de la descripción se comparan con otros métodos que combinan enfoques quimioterapéuticos e inmunológicos para tratar cánceres. Por ejemplo, como se muestra en la Fig. 1, las citoquinas y otros factores que pueden estimular el sistema inmune, incluyendo el sistema innato, se pueden administrar a un paciente sistémicamente, dando como resultado la expansión de muchas clases de células del sistema inmune entero de los pacientes. Sin embargo, cuando, a continuación, se administra el agente quimioterapéutico, la toxicidad del agente

puede reducir o destruir eficazmente las propias células del sistema inmune, eliminando de ese modo los beneficios potenciales de un sistema inmune desarrollado.

Un protocolo alternativo, como se muestra en la Fig. 17, comprende aislar células de la médula ósea de un sujeto y someter a transducción las células con un vector de ácido nucleico, tal como, pero no se limita a, un vector de lentivirus, en el que el vector comprende una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codificante de un polipéptido que puede conferir resistencia al agente quimioterapéutico seleccionado para su uso en el tratamiento de un cáncer, como se muestra en la Fig. 13, por ejemplo. En un sistema experimental, como se muestra en la Fig. 17, se pueden trasplantar células de la médula sometidas a transducción en un sujeto receptor que ha tenido el sistema inmune destruido por radiación de alto nivel. Si, a continuación, estos sujetos reciben una inoculación de célula tumoral desarrollarán un tumor(es), como se muestra en las Fig. 18 y 19, y como se discute en McMillin y col. (2006) *Hum. Gene Therapy* 17:798-806. Si, a continuación, el sujeto recibe o bien el agente quimioterapéutico seleccionado o un inductor de células inmunes dirigidas a cáncer (en este caso por administración de anticuerpos anti-CD137), entonces se observan las reducciones en los tamaños de los tumores (en las Fig. 18 y 19, tumores de sarcoma AG104).

En algunos protocolos que combinan inmunoterapia y quimioterapia para tratar cánceres en un paciente humano o paciente objeto, se pueden administrar citoquinas (IL-2, IL-12, GM-CSF, y similares) a un paciente para fomentar la formación de linfocitos citotóxicos. En otros métodos, se puede emplear un anticuerpo específico anti-CD137. CD137 es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (FNT)/factor de crecimiento nervioso (FCN) de receptores y se expresa por linfocitos T y B activados y monocitos; se ha encontrado que su ligando juega un importante papel en la regulación de las respuestas inmunes. Un anticuerpo monoclonal anti-CD137 puede unirse específicamente a células inmunes que expresan CD137 tales como linfocitos T activados y células dendríticas (CD) de ratón recientemente aisladas, estimulando de ese modo una respuesta inmune, en particular de una respuesta de linfocito T citotóxico, frente a células tumorales.

También se ha observado que la reducción en tumores puede ser transitoria cuando se usa un agente quimioterapéutico (Fig. 18), y la reducción inmunoterapéutica en el tamaño del tumor también puede mostrar una recuperación (Fig. 19). Por el contrario, si el agente quimioterapéutico y la inmunoterapia se administran juntos o secuencialmente al sujeto, entonces, se ve una reducción significativa y prolongada en el tamaño del tumor (Fig. 20). También se incrementó la supervivencia del sujeto animal tratado. La transferencia de esplenocitos desde tal sujeto tratado con éxito a un sujeto inyectado con una población de célula cancerosa dio como resultado supervivencia incrementada (Fig. 21) mostrando la prolongación de células específicas a cáncer después de la curación de un cáncer. Los experimentos, resumidos en la Fig. 22, muestran que la aplicación de transducción de una resistencia a fármaco a células del sistema inmune permite la aplicación práctica de una combinación de quimioterapia e inmunoterapia para incrementar la supervivencia, y la destrucción de tumores. Este método también se ha aplicado a la regresión de tumores muy grandes, como se muestra en la Fig. 23.

Aunque los protocolos de tratamiento para su uso frente a tumores cancerosos han sido de algún éxito, como se evidencia por los datos presentados en las Fig. 15 a 23, el éxito de tales métodos con tumores de glioblastoma ha sido mínimo, con supervivencia prolongada del paciente no alargándose más allá de 24 meses. Por consiguiente, los métodos de la presente descripción proporcionan una etapa de inmunoterapia alternativa que emplea células inmunes citotóxicas aisladas, y particularmente la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$ que pueden reconocer específicamente, unirse a, y destruir células cancerosas que producen el antígeno de estrés de superficie celular MICA/B. Los linfocitos T $\gamma\delta$ comprenden solamente aproximadamente el 5 % de los linfocitos T circulantes totales y forman un componente poderoso del sistema de defensa innato. En los métodos de la descripción, las células CD4-CD8 se pueden aislar de las poblaciones de linfocitos T por tales métodos bien conocidos como FACS y se cultivan *in vitro* para ampliar el tamaño de la población.

Por consiguiente, los métodos de la presente descripción proporcionan células inmunes citotóxicas, tales como linfocitos T $\gamma\delta$, que están genéticamente modificados para comprender un ácido nucleico heterólogo que, cuando se expresa en las células confiere sobre ellas resistencia al agente quimioterapéutico. Entonces, los linfocitos T modificados, son capaces de sobrevivir durante el suficiente tiempo para destruir eficazmente la mayoría si no todas las células cancerosas diana.

A continuación, se ha mostrado que los animales injertados con células de glioblastoma tienen un tiempo de supervivencia significativamente incrementado cuando se proporciona el tratamiento combinado de un agente quimioterapéutico y los linfocitos T $\gamma\delta$ resistentes a agente genéticamente modificados apropiados que son resistentes al agente quimioterapéutico, en comparación con los animales que han recibido solamente el agente.

La modificación genética de las células inmunes citotóxicas aisladas puede ser por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, pero no se pretende que sea limitante, los linfocitos T $\gamma\delta$ aislados se pueden someter a transfección con un vector de lentivirus tal como VIS que comprende una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codificante de una variante de la proteína MGMT (por ejemplo, una variante P104K). La eficiencia de la transducción puede ser mostrada por transfección conjunta de las células con un vector de lentivirus que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína indicadora tal como, pero no se limita a, proteína verde

fluorescente aumentada (EGFP) o similares. La transferencia de MGMT a células confiere sobre ellas resistencia a agente alquilantes de ADN, como se muestra, por ejemplo, en la Fig. 7. Igualmente, usando un vector de lentivirus de VIS recombinante, los linfocitos T $\gamma\delta$ se pueden someter a transfección con por ejemplo MGMT, como se muestra en la Fig. 8.

Por lo tanto, un aspecto de la presente descripción, incluye métodos para reducir un cáncer en un paciente, comprendiendo las etapas de: obtener una población de células inmunes citotóxicas aisladas, en la que las células inmunes citotóxicas aisladas han sido genéticamente modificadas para ser resistentes a un agente terapéutico; administrar a un paciente en necesidad de la misma, una cantidad eficaz del agente terapéutico; y administrar al paciente la población de células inmunes citotóxicas genéticamente modificadas aisladas, con lo cual las células inmunes citotóxicas se administran al tumor, reduciendo de ese modo el cáncer en el paciente.

En la presente descripción, las células inmunes citotóxicas aisladas pueden ser linfocitos T $\gamma\delta$.

En realizaciones de este aspecto de la descripción, las células inmunes citotóxicas aisladas se pueden aislar del paciente que tiene el cáncer.

En algunas realizaciones de este aspecto de la descripción, las células inmunes citotóxicas aisladas se pueden aislar de una fuente distinta del paciente en necesidad de las mismas.

En realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico puede tener la característica de inducir una proteína de estrés en una célula cancerosa del paciente, en la que la proteína de estrés se reconoce por las células inmunes citotóxicas.

En realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico citotóxico caracterizado por una célula que desarrolla resistencia a dicho agente terapéutico cuando la célula recibe un ácido nucleico heterólogo, y en la que el ácido nucleico heterólogo se expresa en la célula.

En las realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en: un agente alquilante, un antagonista metabólico, un antibiótico antitumor y un agente antitumoral derivado de planta.

En algunas realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en: una ciclofosfamida, una fosfamida, un metotrexato, un nucleótido sustituido, un nucleósido sustituido, fluorouracilo, una mitomicina, adriamicina, vincristina, vindesina, Taxol, cisplatina, carboplatino y etopósido.

En realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste en: TRIMETOTRIXATO™ (TMTX), metotrixato (MTX), TEMOZOLOMIDA™, RALTRITREXED™, S-(4-nitrobenzil)-6-tioinosina (NBMPR), CAMPTOTECINA™, 6-bencilguanidina, y un derivado terapéutico de cualquiera de los mismos.

En realizaciones de este aspecto de la descripción, la etapa de obtener una población de células inmunes citotóxicas aisladas genéticamente modificadas para ser resistentes a un agente terapéutico puede comprender: aislar de un sujeto humano o animal una población de células inmunes citotóxicas; cultivar la población aislada de las células inmunes citotóxicas, incrementando de ese modo la población de las células; sometiendo a transfección de manera estable la población de las células inmunes citotóxicas con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga unida de manera operable a un promotor, en el que la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifica un polipéptido que confiere la resistencia celular al agente terapéutico.

En realizaciones de este aspecto de la descripción, la población de células inmunes citotóxicas sometidas a transfección de manera estable se puede conservar de manera viable.

En algunas realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico puede ser TRIMETOTRIXATO™ o metotrexato, y la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifica dihidrofolato reductasa, o un derivado de la misma.

En otras realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico puede ser TEMOZOLOMIDA™, o un agente terapéuticamente derivado de la misma, y la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga puede codificar O⁶ metilguanina ADN metiltransferasa, o un derivado de la misma.

En realizaciones de este aspecto de la descripción, las células inmunes citotóxicas genéticamente modificadas aisladas y el agente terapéutico se pueden administrar conjuntamente al paciente.

En algunas realizaciones de este aspecto de la descripción, las células inmunes citotóxicas genéticamente modificadas y el agente terapéutico se pueden administrar secuencialmente al paciente.

En realizaciones de este aspecto de la descripción, las células inmunes citotóxicas genéticamente modificadas se administran al paciente directamente dentro del tumor o a un vaso sanguíneo proximal y que se dirige al interior del tumor.

5 En algunas realizaciones de este aspecto de la descripción, el tumor es un glioblastoma.

Otro aspecto más de la presente descripción proporciona sistemas para tratar un cáncer en un paciente que comprende un agente terapéutico citotóxico que tiene las características de inhibir la supervivencia de una célula cancerosa, y una población aislada de células inmunes citotóxicas, en la que las células inmunes citotóxicas están genéticamente modificadas para ser resistentes al agente terapéutico.

En la presente descripción, las células inmunes citotóxicas pueden ser linfocitos T $\gamma\delta$.

15 En realizaciones de este aspecto de la descripción, la población de células inmunes citotóxicas puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga unida de manera operable a un promotor, en la que la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifica un polipéptido que cuando se expresa en una célula confiere resistencia al agente terapéutico a la célula.

20 En realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en: un agente alquilante, un antagonista metabólico, un antibiótico antitumoral y un agente antitumoral derivado de planta.

25 En algunas realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: TRIMETOTRIXATO™ (TMTX), metotrixato (MTX), TEMOZOLOMIDA™, RALTRITREXED™, S-(4-nitrobencil)-6-tioinosina (NBMPR), CAMPTOTECINA™, 6-bencilguanidina, y un derivado terapéutico de cualquiera de los mismos.

30 En ciertas realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico es TRIMETOTRIXATO™ o metotrixato, y la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifica dihidrofolato reductasa, o un derivado de la misma.

35 En algunas realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico es TEMOZOLOMIDA™, o un agente terapéuticamente derivado de la misma, y la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga puede codificar O⁶ metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT), o un derivado de la misma.

40 Aun otro aspecto de la descripción proporciona sistemas para tratar un glioblastoma en un paciente comprendiendo un agente terapéutico que tiene las características de inhibir la supervivencia de una célula cancerosa e inducir una proteína de estrés en la célula cancerosa, y una población aislada de células inmunes citotóxicas, en la que las células inmunes citotóxicas son linfocitos T $\gamma\delta$, y en la que dichos linfocitos T $\gamma\delta$ se han modificado genéticamente para ser resistentes al agente terapéutico.

45 En la presente descripción, la población de linfocitos T $\gamma\delta$ comprende una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga unida de manera operable a un promotor, en la que la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifica un polipéptido que cuando se expresa en una célula confiere resistencia al agente terapéutico a la célula.

En realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico citotóxico seleccionado del grupo que consiste en: un agente alquilante, un antagonista metabólico, un antibiótico antitumoral, y un agente antitumoral derivado de planta.

50 En algunas realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: TRIMETOTRIXATO™ (TMTX), metotrixato (MTX), TEMOZOLOMIDA™, RALTRITREXED™, S-(4-nitrobencil)-6-tioinosina (NBMPR), CAMPTOTECINA™, 6-bencilguanidina, y un derivado terapéutico de cualquiera de los mismos.

55 En algunas realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico es TRIMETOTRIXATO™ o metotrixato, y la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga codifica dihidrofolato reductasa, o un derivado de la misma.

60 En otras realizaciones de este aspecto de la descripción, el agente terapéutico es TEMOZOLOMIDA™, o un agente terapéuticamente derivado de la misma, y la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga puede codificar O⁶ metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT), o un derivado de la misma.

65 Se debería indicar que las relaciones, concentraciones, cantidades y otros datos numéricos se pueden expresar en el presente documento en un formato de intervalo. Hay que entender que tal formato de intervalo se usa por conveniencia y brevedad y, por tanto, se debería interpretar, de una manera flexible, que incluye no solo los valores numéricos explícitamente citados como los límites del intervalo, sino también incluye todos los valores numéricos

individuales o subintervalos incluidos dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y subintervalo estuvieran explícitamente citados. Para ilustrar, un intervalo de concentración de “aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 %” se debería interpretar que incluye no solo la concentración explícitamente citada de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso, sino también incluye concentraciones individuales (por ejemplo, 1 %, 2 %, 3 % y 4 %) y los subintervalos (por ejemplo, 0,5 %, 1,1 %, 2,2 %, 3,3 %, y 4,4 %) dentro del intervalo indicado. El término “aproximadamente” puede incluir ± 1 %, ± 2 %, ± 3 %, ± 4 %, ± 5 %, ± 6 %, ± 7 %, ± 8 %, ± 9 % o ± 10 %, o más del(de los) valor(es) numérico(s) a modificar. Además, la frase “aproximadamente x a y” incluye “aproximadamente x a aproximadamente y”.

Se debería hacer hincapié en que las realizaciones anteriormente descritas de la presente descripción son meramente ejemplos posibles de aplicaciones, y se explican meramente para un entendimiento claro de los principios de esta descripción. Se pueden realizar muchas variaciones y modificaciones a la(s) realización(es) anteriormente descrita(s) de la descripción sin apartarse considerablemente del espíritu y los principios de la descripción. Todas tales modificaciones y variaciones se pretenden que estén incluidas en el presente documento dentro del alcance de esta descripción y protegidas por las siguientes reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación y titulación de retrovirus recombinante: Los ADN codificantes de P140KMGM T y eGFP humanos se amplificaron por PCR usando cebadores apropiados (tales como, por ejemplo, para: MGMT: Directo: AAAGTGGAGCTGTCTGGCTGTGAA, Inverso: AAAGTCTCCTGCTGGAACACTGGA; y DHFR: Directo: CATGGGAATTGGCAAGAATGGCGA, Inverso: TGACCAGGTTCTGTTTCCCTTCCA) y se insertaron en el vector de expresión apropiado. Las secuencias, codón optimizado para la expresión en células de mamífero, codificantes de MGMT y DHFR, están representadas en la Fig. 29.

Se usó un sistema de cuatro plásmidos para generar lentivirus de VIS recombinante. La transducción transitoria se llevó a cabo en células productoras 293T usando métodos anteriormente detallados (Cesano y col., (1998) *Anticancer Res.* 18:2.289-2.295). Los títulos del virus codificante de eGFP y P140KMGM T se determinaron mediante métodos de citometría de flujo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real respectivamente (Cesano y col., (1998) *Anticancer Res.* 18:2.289-2.295; McMillin y col., (2006) *Hum. Gene Ther.* 17:798-806).

Ejemplo 2

Transducción de lentivirus: Las transducciones de partículas de lentivirus basadas en VIS se realizaron incubando células con virus en medios complementados con polibreno (8 mg/ml; Specialty Media, Phillipsburg, NJ). Veinticuatro horas después de la transducción, se reemplazó el medio que contenía virus con medio fresco y las células sometidas a transducción se cultivaron hasta alcanzar aproximadamente el 70 a 90 % de confluencia en el momento en que las células se usaron para aplicaciones posteriores.

Eficacias de transducción de lentivirus de células NK-92, TALL-104 y K562: se evaluó inicialmente la eficacia de transducción en células NK-92, TALL-104 y K562 usando un lentivirus de VIS recombinante de autoinactivación (SIN), pseudotipado con la proteína de la envoltura VSV-G, codificante de eGFP, cuyas construcciones se muestran esquemáticamente en la Fig. 25A.

La expresión de eGFP en la construcción indicadora de lentivirus se condujo por el promotor del virus de células madre murino. Para medir las eficacias de transducción, se inocularon todas las líneas celulares con una MDI de 40 y la fluorescencia de GFP se analizó mediante citometría de flujo a 72 horas después de la transducción. La transducción de cada línea celular dio como resultado expresiones fuertes de eGFP (visualizadas por microscopía de fluorescencia) que se cuantificaron como 90 %, 41 % y 99 % en las líneas celulares NK-92, TALL-104 y K562, respectivamente, como se muestra en las Fig. 25B a 25D. Por tanto, se alcanzan altas eficacias de transducción para tanto las líneas celulares NK-92 como K562, y la línea celular TALL-104 presentaba eficacia de transducción moderada.

Ejemplo 3

Análisis de la curva de supervivencia: Se expusieron células no modificadas y modificadas por P104KMGM T 2 horas a 6-BG (25 μ M) seguido de exposición a concentraciones crecientes de TMZ durante 48 horas. A continuación, se accedió a la viabilidad celular mediante un método de exclusión de azul de tripán estándar. Todos los fármacos se prepararon recién el día del tratamiento con fármaco.

Para determinar la eficacia de P140KMGM T resistente a fármaco, se incubaron células inmunocompetentes no sometidas a transducción y sometidas a transducción con 6-BG durante 2 horas. Se añadió TMZ a concentraciones crecientes, y las células se incubaron durante 48 horas. Las curvas de supervivencia se generaron con respecto a las células no sometidas a transducción.

Las células NK-92, TALL-104 y K562 sometidas a transducción con P140KMGMT eran resistentes a la combinación de 6-BG/TMZ cuando se compararon con células control no sometidas a transducción, como se muestra en la Fig. 26A). Tal resistencia se pronunció hasta TMZ 200 μ M, en el momento en que casi todas las células modificadas sobrevivieron a la exposición a fármaco.

Los grados de resistencia alcanzados por modificación genética de cada una de las líneas celulares se midieron calculando el valor CI_{50} de TMZ. El CI_{50} de 6-BG/TMZ basado en 48 horas de exposición era de $360 \pm 8 \mu$ M y $135 \pm 4 \mu$ M, respectivamente, en las células NK-92 gen-modificadas y no modificadas; $385 \pm 5 \mu$ M y $120 \pm 6 \mu$ M, respectivamente, en las células TALL-104 gen-modificadas y no modificadas; y $550 \pm 8 \mu$ M y $170 \pm 10 \mu$ M, respectivamente, en las células K562 gen-modificadas y no modificadas. Cada una de las líneas celulares, por lo tanto, mostraron aproximadamente una resistencia tres veces mayor a TMZ en un ensayo de viabilidad de 48 horas. Se han alcanzado niveles de resistencia similares en células madre hematopoyéticas y células K562, pero usando un ensayo de supervivencia de 7 a 10 días (Gangadharan y col., (2006) *Blood*. 107:3.859-3.864). La elección del presente periodo de ensayo de 48 horas se basó en los ensayos citotóxicos de procesamiento posteriores.

Ejemplo 4

Ensayo de citotoxicidad: Las células, crecidas en presencia de 100 U/ml de IL-2 humana recombinante, se expusieron a 6-BG 25 μ M durante 2 horas seguido de la adición de TMZ 200 μ M e incubación de ellas durante la noche. Para determinar la concentración de célula efectora que daba como resultado la muerte máxima de las células diana, se colocaron 4.000 células (D) en placas de 96 pocillos y se mezclaron con las células efectoras (E) (NK-92 o TALL-104) en relaciones E:D de 2,5:1, 5:1 y 10:1 (por triplicado) seguido de una incubación de 4 horas. La cantidad de LDH liberado al sobrenadante como resultado de la citólisis de las células diana se midió en un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Las citotoxicidades se expresaron como % de actividad citotóxica de las células efectoras según la siguiente fórmula:

% citotoxicidad=

$$\frac{(\text{Liberación experimental} - \text{Liberación espontánea}_{\text{efector}}) - \text{Liberación espontánea}_{\text{diana}}}{\text{Liberación máxima}_{\text{diana}} - \text{Liberación espontánea}_{\text{diana}}} \times 100$$

Para determinar la eficacia de las modificaciones génicas tenidas sobre las citotoxicidades de las células efectoras, las células efectoras no modificadas/gen-modificadas (E/Em) y diana (D/Dm) se expusieron a 6-BG/TMZ durante 24 horas y se realizaron ensayos citotóxicos como se detalló anteriormente.

Variantes resistentes a fármaco de líneas celulares NK-92 y TALL-104 median la muerte eficaz de célula diana: Se ha informado que las líneas celulares NK-92 y TALL-104 pueden lisar eficazmente la línea celular K562 leucémica. En el presente ejemplo, se determinó si la modificación genética de estas líneas celulares inmunoelectoras daba como resultado un cambio en sus capacidades citotóxicas hacia la línea celular diana K562. Por consiguiente, las células efectoras gen-modificadas y no modificadas se mezclaron con un número fijado de las células diana a diversas relaciones efector:diana de 2,5:1, 5:1 y 10:1. La eficacia de destrucción de cada una de las células efectoras resistentes a fármaco se comparó con la de las células control no modificadas en un ensayo de citotoxicidad de 4 horas. Cuando se comparó con la de las células no modificadas, ambas células inmunoelectoras resistentes a fármaco gen-modificadas, NK-92 y TALL-104, mostraron actividades citolíticas similares hacia la línea celular diana, como se muestra en la Fig. 2B, estableciendo de ese modo que las modificaciones genéticas impartidas a las líneas celulares sometidas a transducción NK-92 y TALL-104, no parecían afectar a las propiedades de citotoxicidad de las células.

Retención de la eficacia citotóxica de células inmunocompetentes gen-modificadas después del desarrollo en presencia de TMZ 200 μ M. Como se muestra en la Fig. 2B, las citotoxicidades de las líneas celulares efectoras gen modificadas seleccionadas a fármaco NK-92 y TALL-104, eran similares a las citotoxicidades de las células efectoras gen-modificadas no seleccionadas. Estos resultados muestran que las líneas celulares inmunocompetentes resistentes a fármaco, después de la modificación con P140KMGMT, conservaban su capacidad de lisar eficazmente células diana.

Ejemplo 5

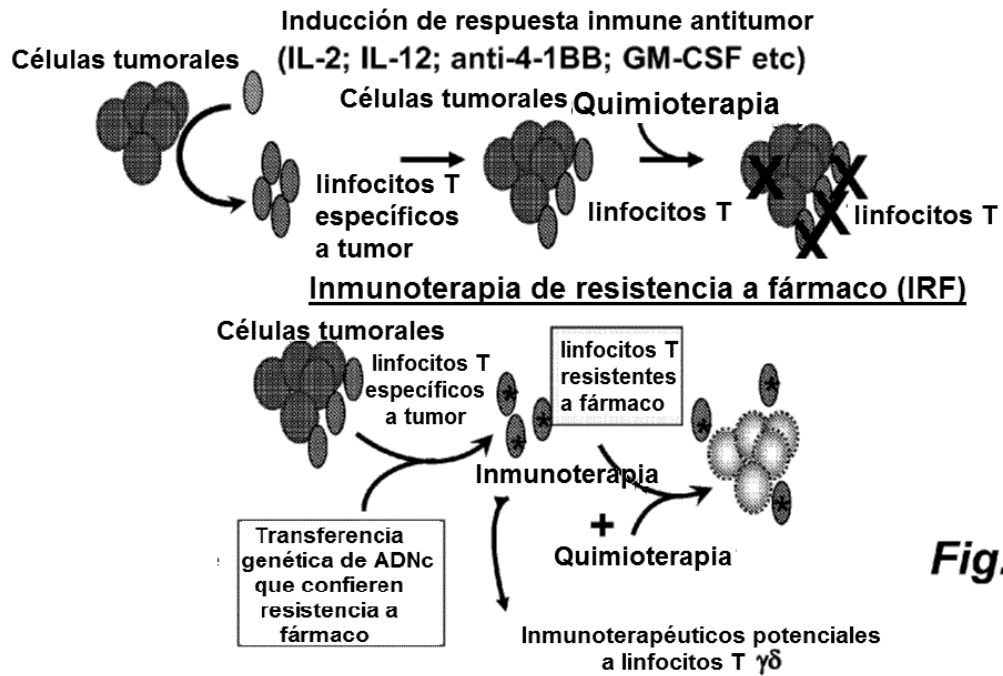
Generación de líneas celulares efectoras y diana resistentes a fármaco por transducción de lentivirus: Se insertó la secuencia de ADNc de P140KMGMT en el vector de expresión de VIS reemplazando la secuencia codificante de eGFP (como se muestra en la Fig. 25A). Los títulos de los virus, determinados usando células 293T como dianas, eran de 10^7 - 10^8 UT/ml. La transferencia de gen dentro de las células efectoras y diana se cuantificó mediante amplificación por PCR a tiempo real usando ADN genómico aislado de células sometidas a transducción con el virus recombinante a una MDI de 40.

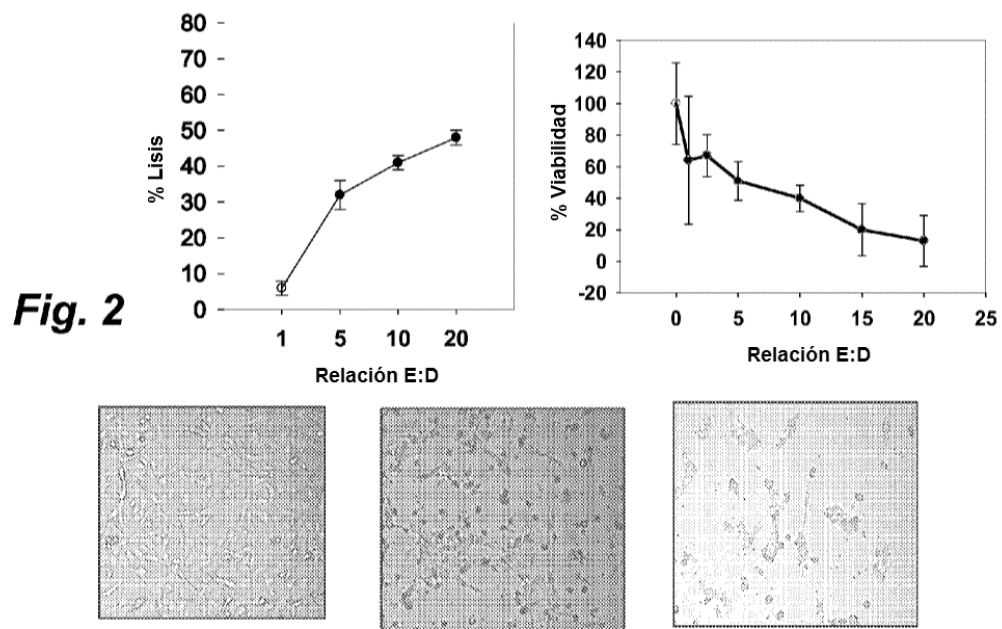
5 Los números de copia de P140KMGMT para las células NK-92, TALL-104 y K562 sometidas a transducción se determinaron para ser $3 \pm 0,28$, $1 \pm 0,14$, y $4 \pm 0,41$, respectivamente. Los niveles de ARNm de MGMT también se midieron en células K562 para confirmar que las células gen-modificadas expresan niveles incrementados de mensajero de MGMT. La expresión de ARNm de MGMT se detectó fácilmente en las células K562 sometidas a transducción, mientras que los niveles de expresión de ARNm de MGMT en células K562 no sometidas a transducción estaban por debajo del intervalo lineal de detección. Estudios anteriores (Gangadharan y col., (2006) *Blood*. 107:3.859-3.864) también informaron de niveles de proteína MGMT extremadamente bajos en células K562 de tipo natural.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición aislada que comprende linfocitos citolíticos naturales, en la que más de aproximadamente el 50 % de los linfocitos citolíticos naturales expresa un polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia.
2. Una composición aislada que comprende linfocitos citolíticos naturales, en la que más de aproximadamente el 50 % de los linfocitos citolíticos naturales comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia.
- 10 3. Una composición aislada que consiste básicamente en linfocitos citolíticos naturales, que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia.
- 15 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el polipéptido que confiere resistencia a un agente de quimioterapia es O⁶ metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT), una variante resistente a fármaco de dihidrofolato reductasa (L22Y-DHFR), timidilato sintasa, o proteína 1 de resistencia a múltiples fármacos (MDR1).

Estrategia para Combinar Quimioterapia e Inmunoterapia





Citotoxicidad de linfocito T $\gamma\delta$ frente a líneas celulares de GBM primario y GBM

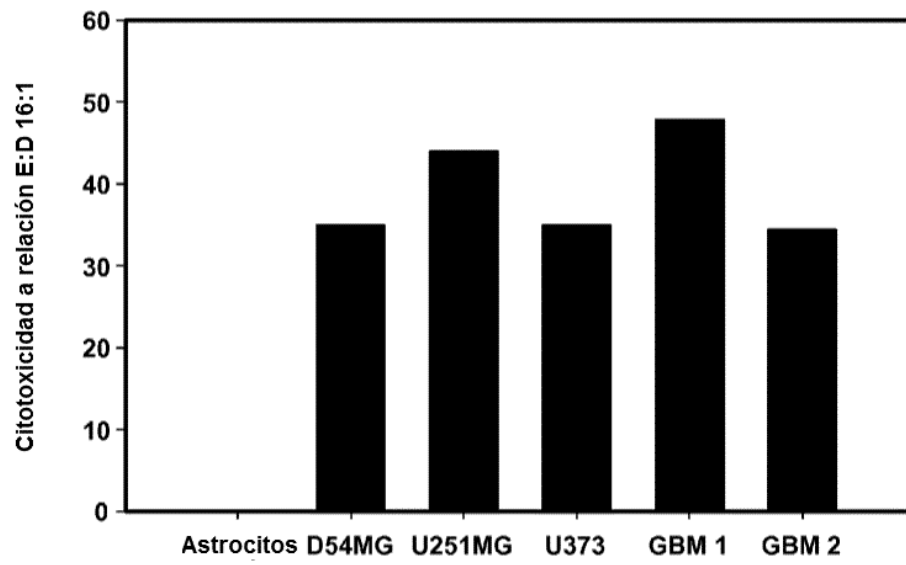
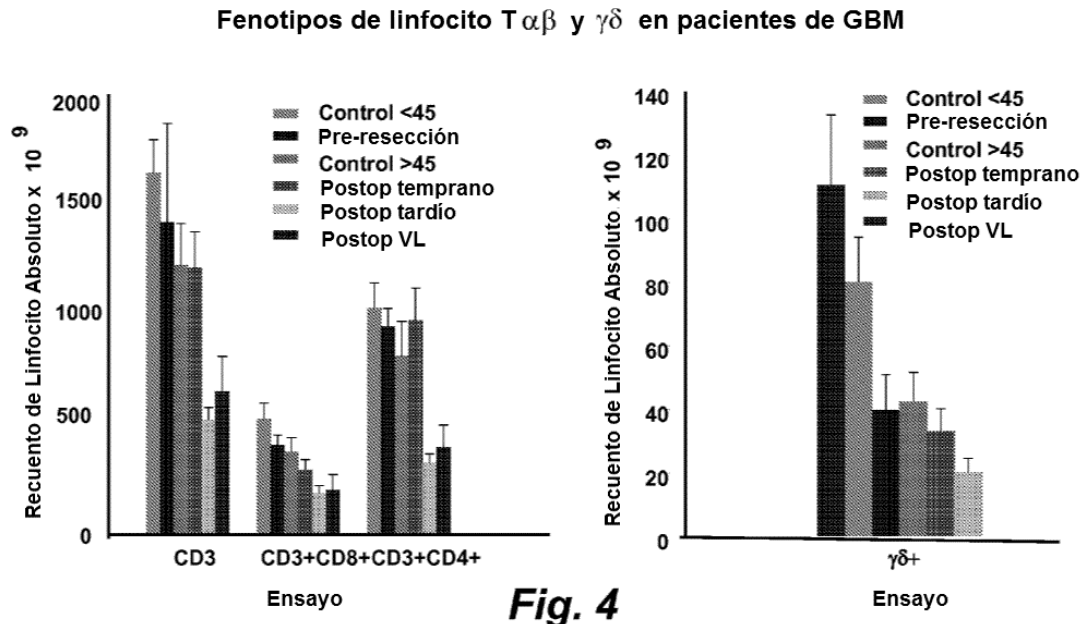
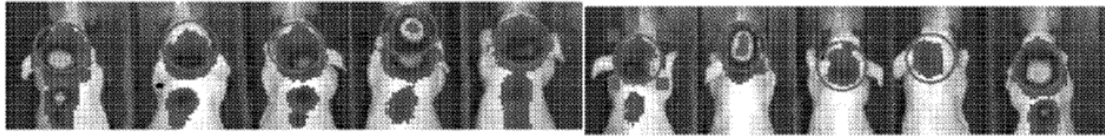


Fig. 3





Ratones inyectados con solución salina



ratones inyectados $\gamma\delta$ (5:1)

Fig. 7

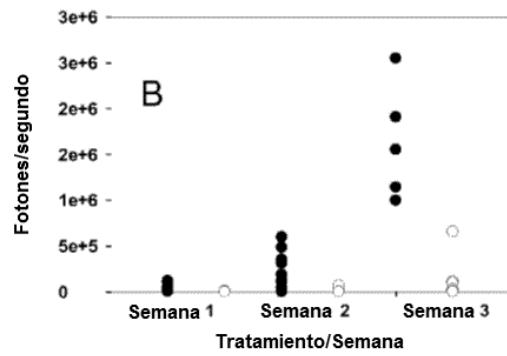


Fig. 8

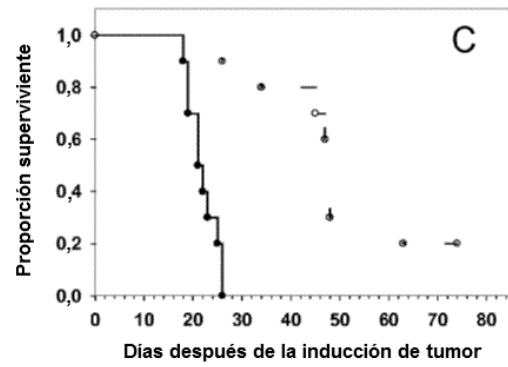


Fig. 9

Temozolamida (TMZ) regula al alza la expresión de
antígenos de estrés sobre líneas celulares GBM...

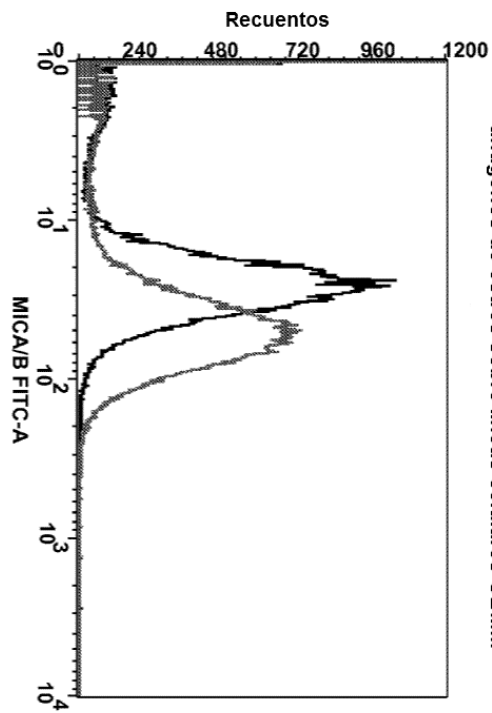


Fig. 5

La regulación ascendente del antígeno de estrés es transitoria

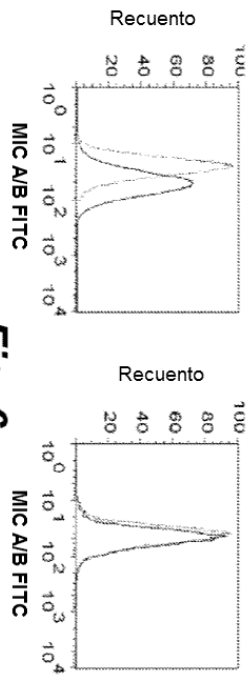
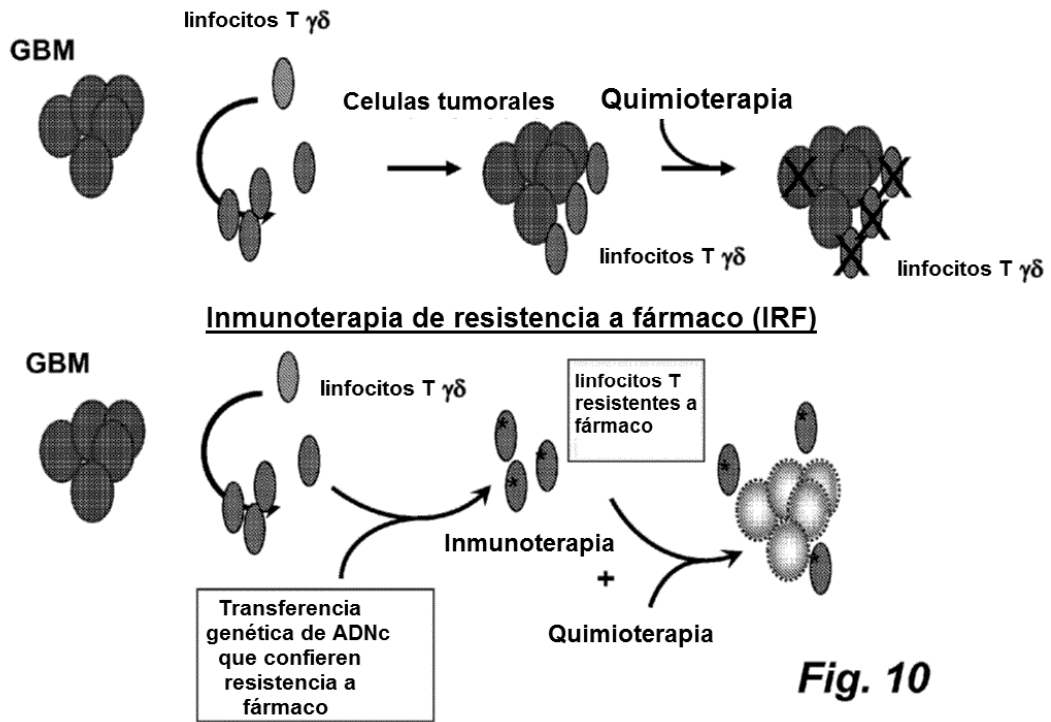


Fig. 6



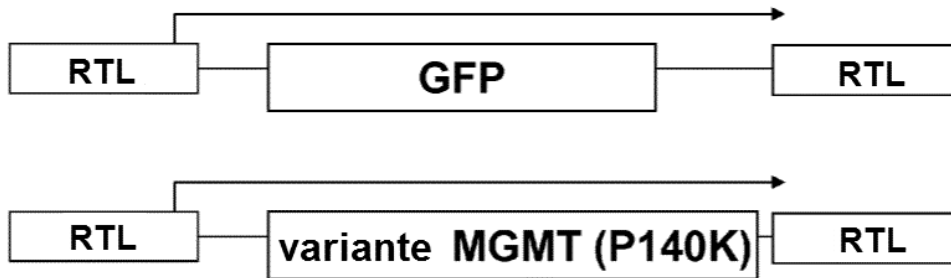


Fig. 12

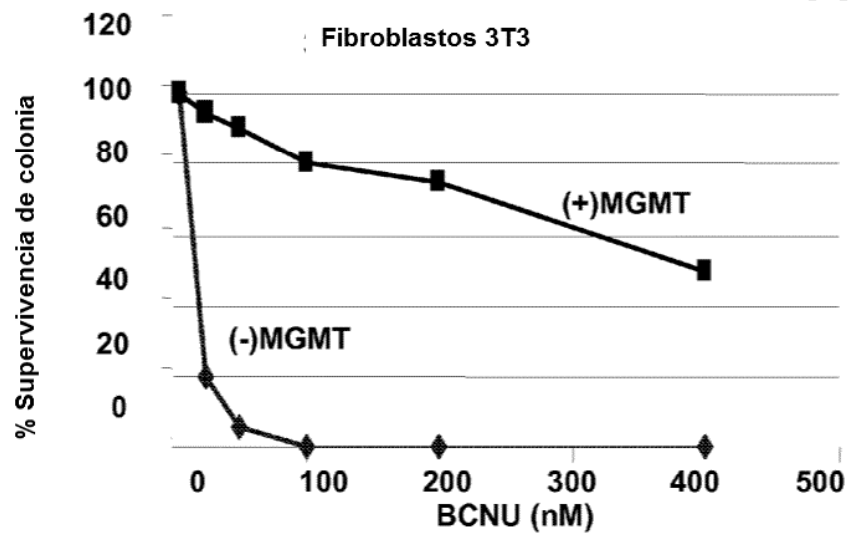


Fig. 11

Modificación genética de linfocitos T $\gamma\delta$: Transducción usando VIS recombinante

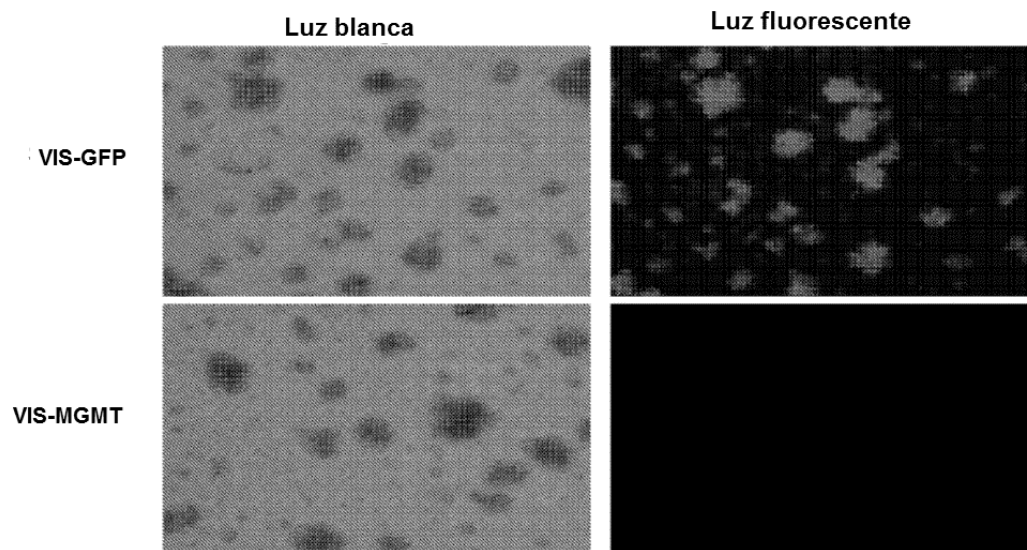


Fig. 13

C3H/HeJ tipo natural o trasplantados con médula ósea tratados con 200 ug x 2 antiCD137 más TMTX:

Dosis baja TMTX destruye la inmunoterapia en ratones trasplantados

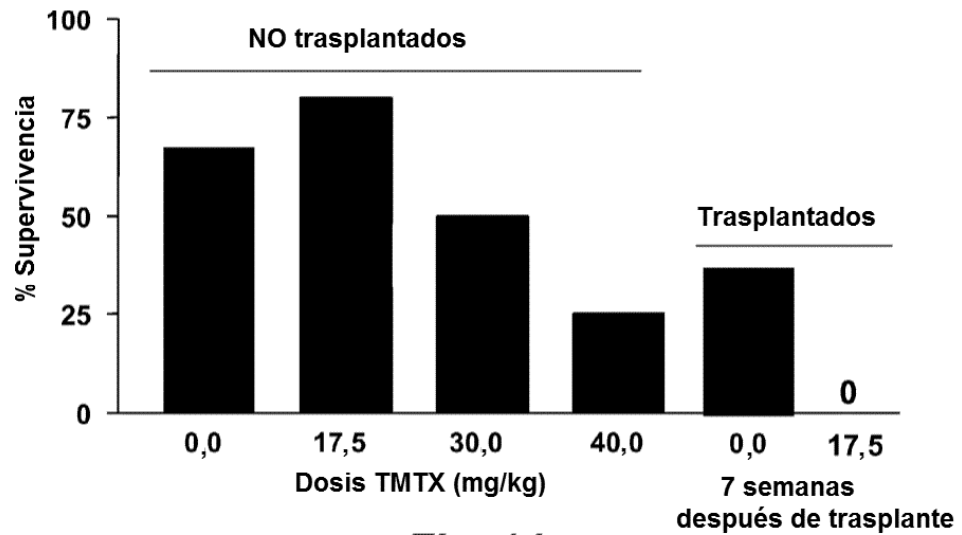


Fig. 14

Diseño experimental: Determinar si la inmunoterapia resistente a fármaco se puede usar para tratar tumores establecidos

LTC específicos a AG104 no se han desarrollado de manera reproducible

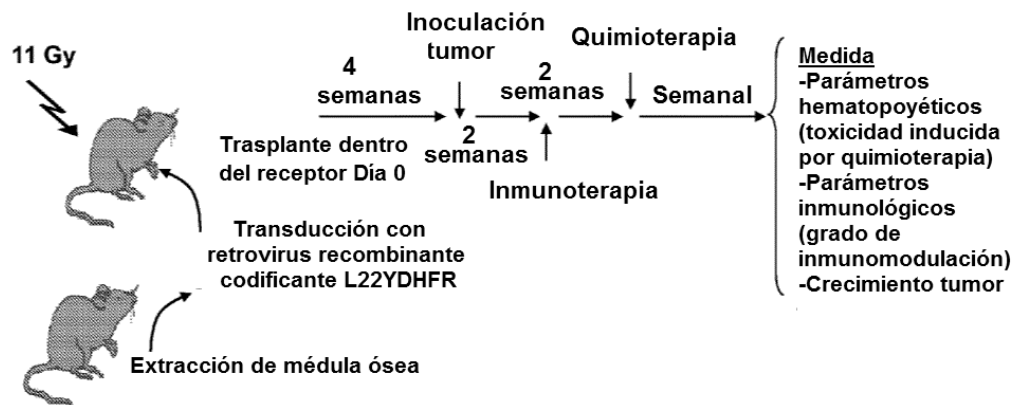


Fig. 15

Tratamiento de células de Sarcoma AG104 usando Quimio o Inmunoterapia

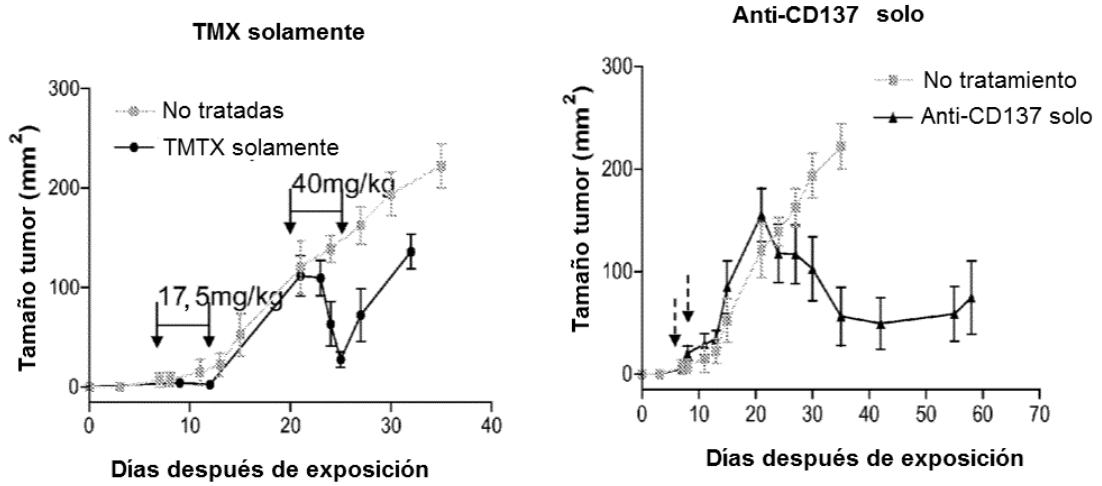


Fig. 16

Tratamiento IRF de Células de Sarcoma AG104

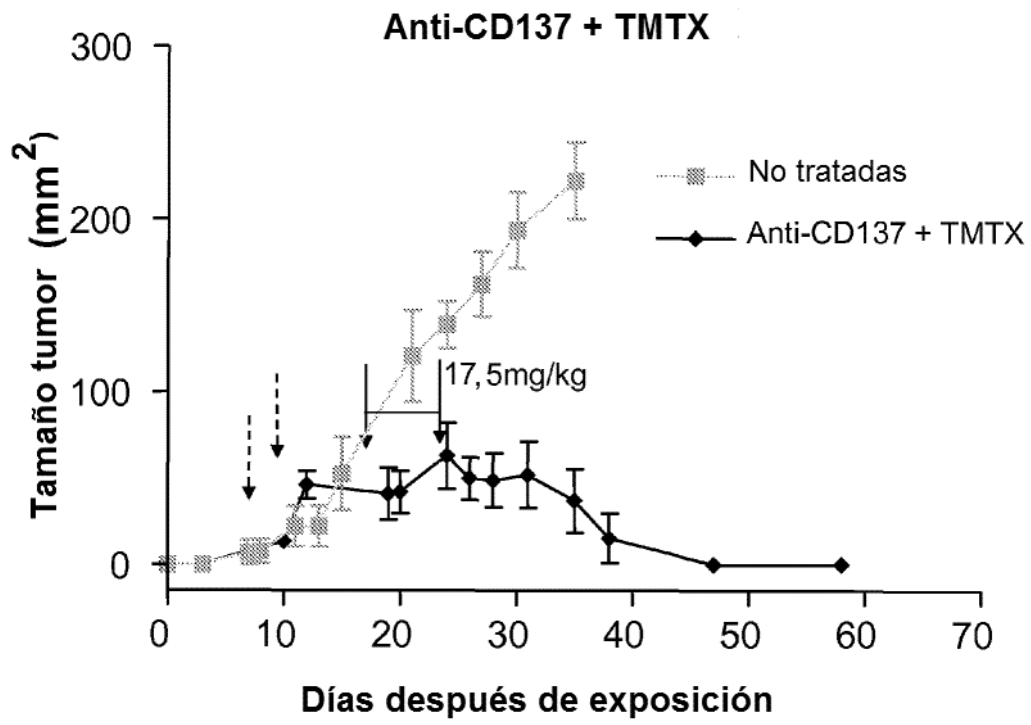


Fig. 17

Supervivencia de ratones trasplantados DHFR

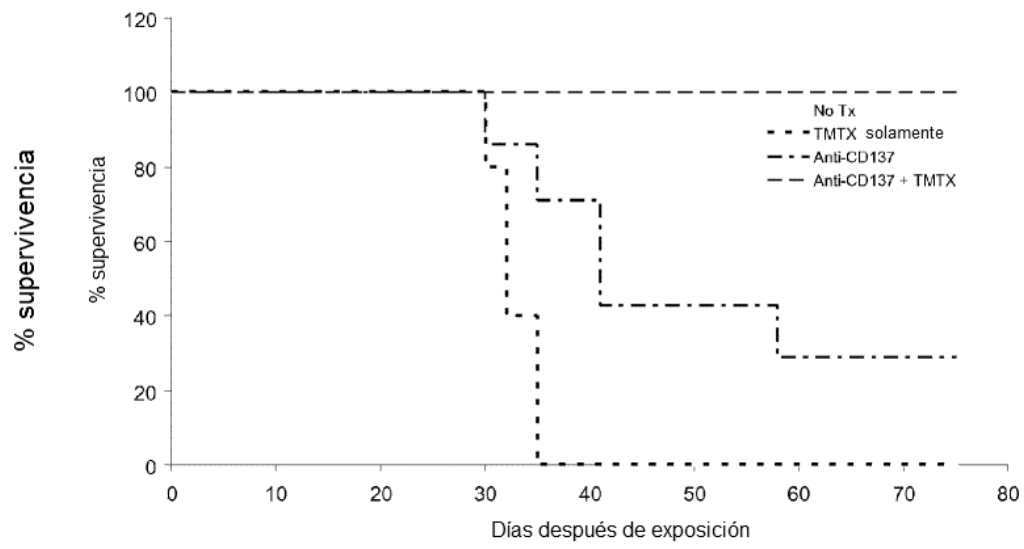


Fig. 18

Transferencia adoptiva de esplenocitos de ratones portadores de tumor o curados

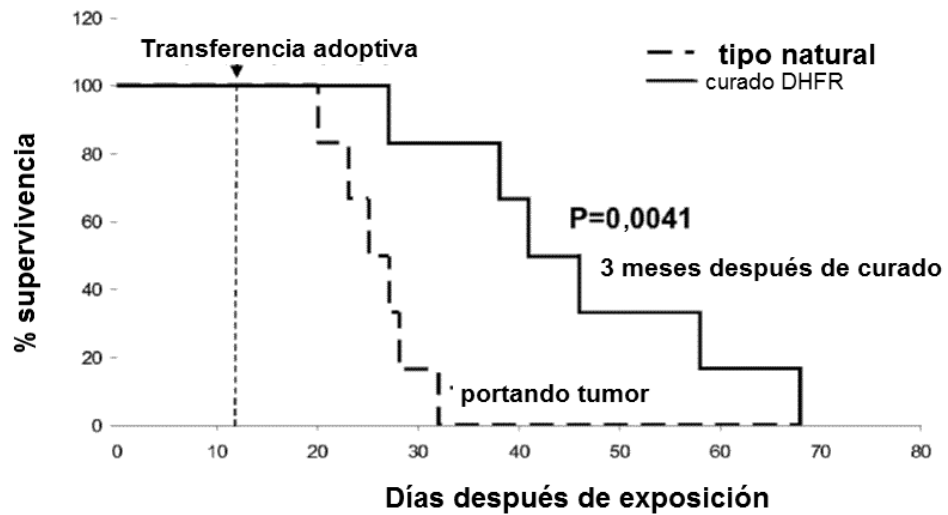


Fig. 19

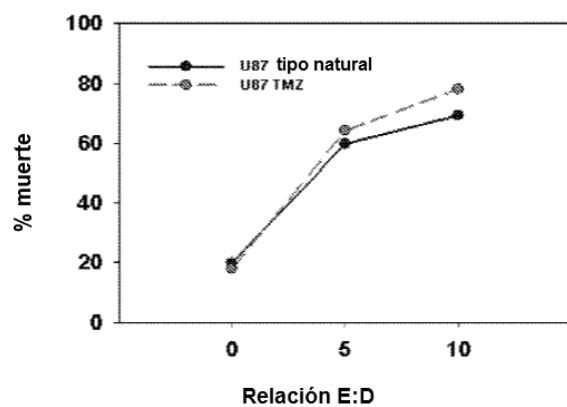


Fig. 20A

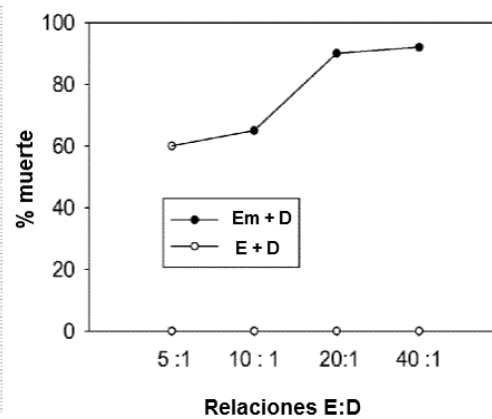


Fig. 20B

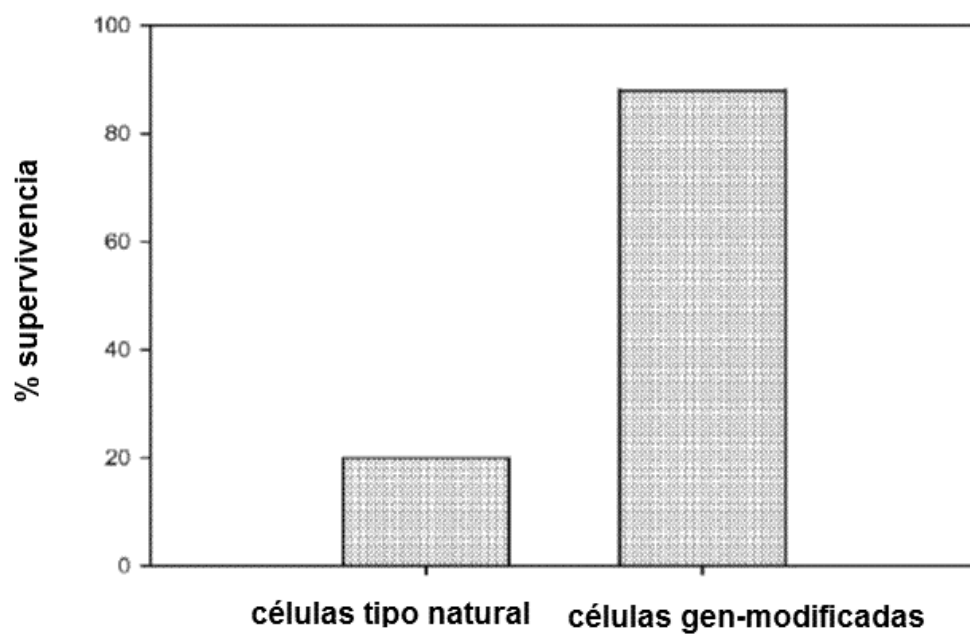


Fig. 21

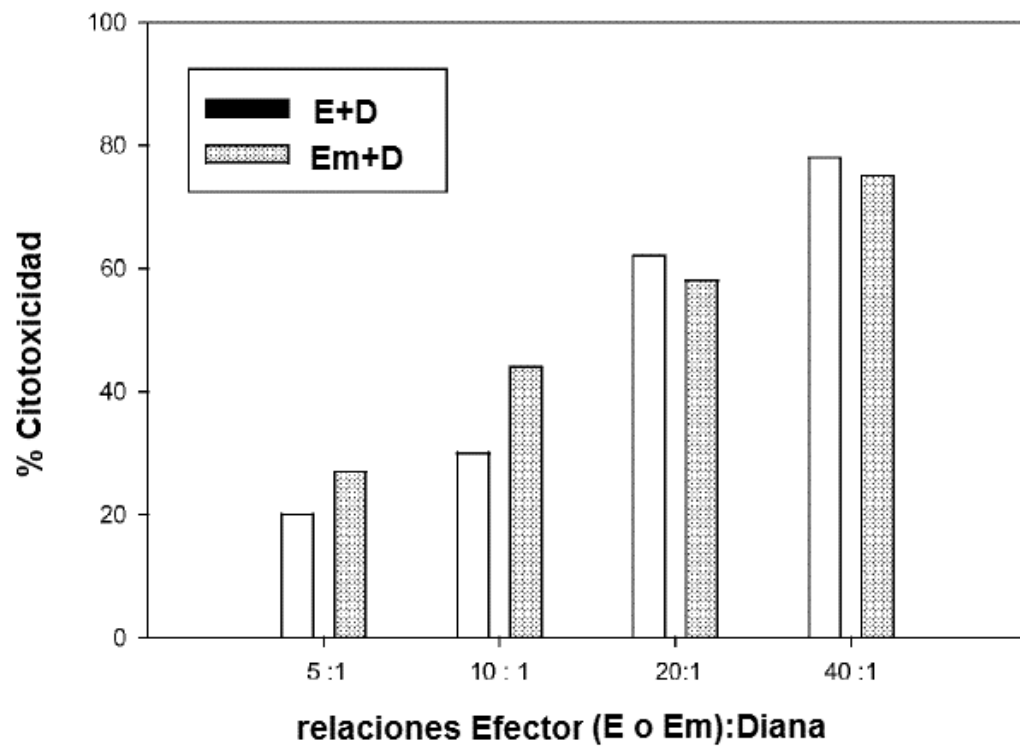


Fig. 22

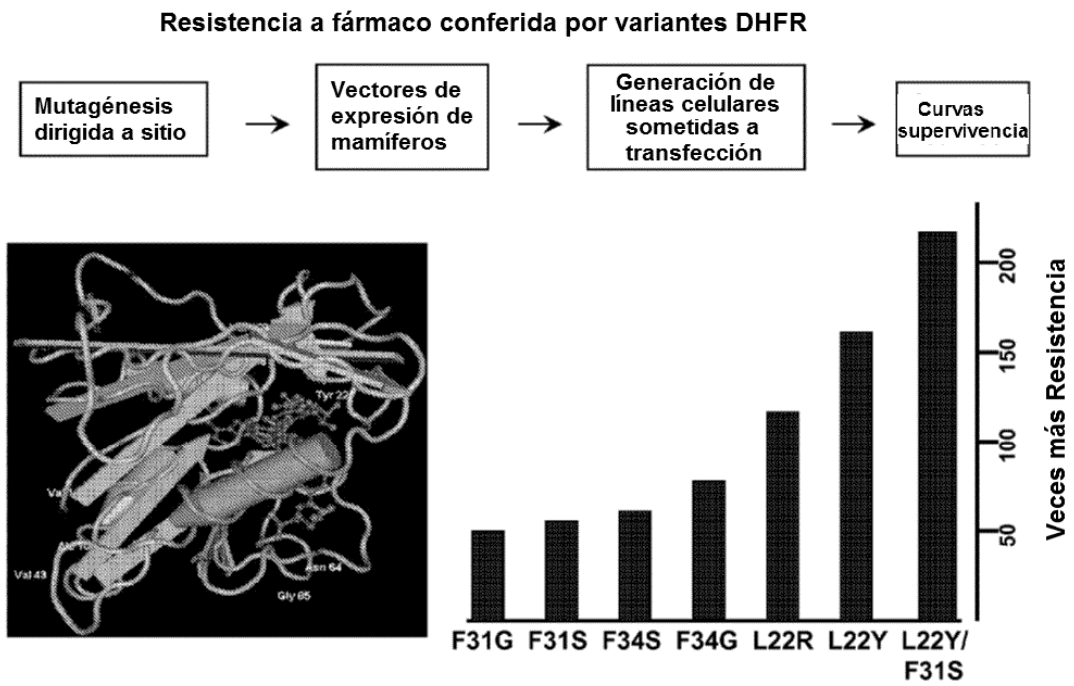


Fig. 23

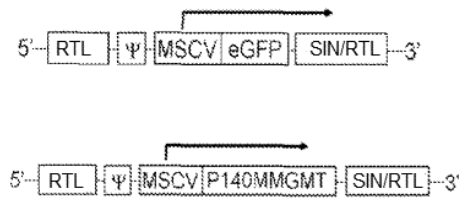


Fig. 24A

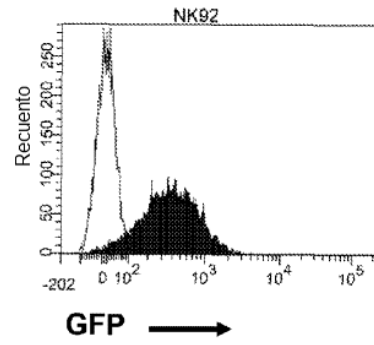


Fig. 24B

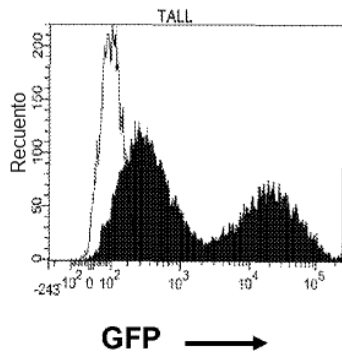


Fig. 24C

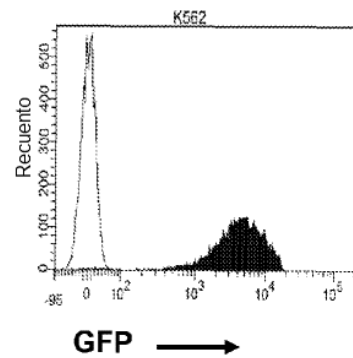


Fig. 24D

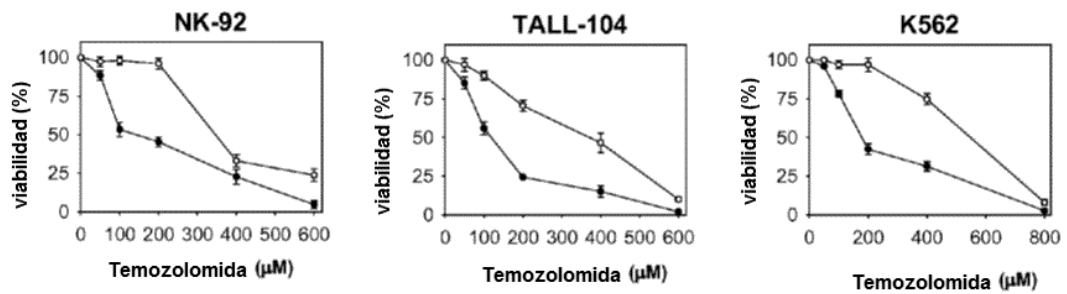


Fig. 25A

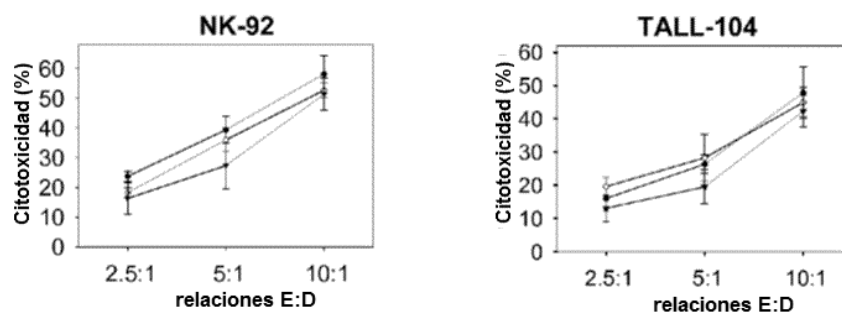


Fig. 25B

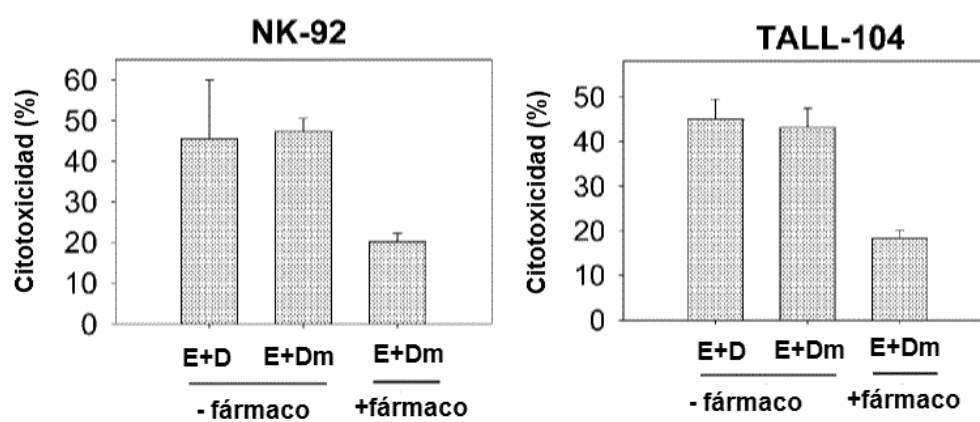


Fig. 26

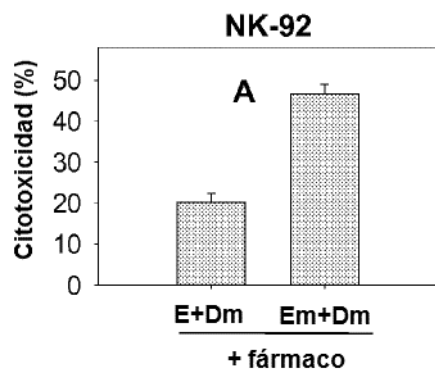


Fig. 27A

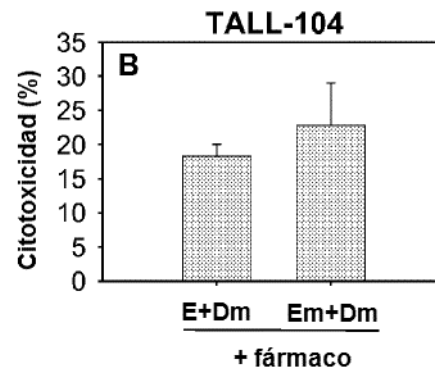


Fig. 27B

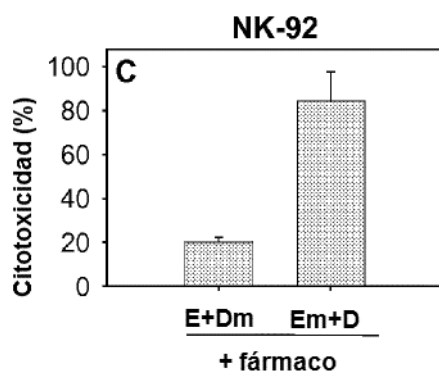


Fig. 27C

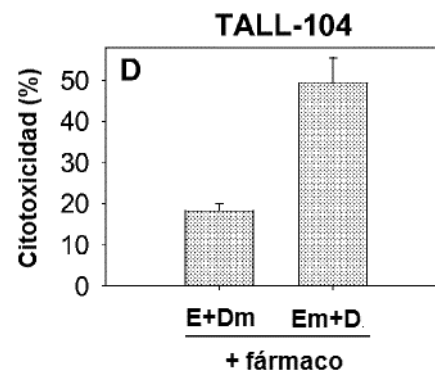


Fig. 27D

Secuencia codón optimizado de MGMT:

ATGGACAAAGATTGCGAGATGAAGCGGACCACACTGGACTCCCCCTGGGCAAACCTGGAGCTGTCTGGCTGTGAA
CAGGGGCTGCACGAGATCAAACCTGCTGGGAAAGGGCACTAGCGCCGCTGATGCTGTGGAAGTGCCAGCTCCAGCT
GCTGTGCTGGGAGGACCTGAGCCACTGATGCAGTGCACCGCCTGGCTGAACGCTTACTTCCATCAGCCTGAAGCC
ATCGAGGAATTTCCCGTGCCTGCCCTGCACCATCCAGTGTTCCAGCAGGAGAGTTTTACAAGGCAGGTGCTGTGG
AAGCTGCTGAAAGTGGTGAAGTTCGGGGAAGTGATTTCTACCAGCAGCTGGCTGCTCTGGCTGGAAACCCAAAA
GCTGCTCGGGCCGTGGGAGGAGCTATGAGAGGCAATCCAGTGAAGATCCTGATTCCTGCCACAGGGTGGTGTGT
AGCTCCGGAGCTGTGGGGAATATTCTGGGGGACTGGCCGTGAAAGAATGGCTGCTGGCTCACGAGGGACATAGG
CTGGGAAAGCCTGGCCTGGGAGGGTCTAGTGGACTGGCTGGAGCTTGGCTGAAGGGAGCTGGAGCTACCTCAGGA
AGCCACCTGCCGCCCGGAATTGA

Secuencia codón optimizado de DHFR:

ATGGTGGGGTCCCTGAACATGCATCGTGGCTGTGTCTCAGAACATGGGAATTGGCAAGAATGGCGACTACCCCTGG
CCCCCTCTGCGGAACGAGTTCAGATATTTTCAGAGGATGACCACAACCTAGCTCCGTGGAAGGGAAACAGAACCTG
GTCATCATGGGAAAGAAAACCTGGTTCAGTATTCCCGAGAAGAACCGCCCTCTGAAAGGACGGATCAATCTGGTG
CTGTCCAGAGAGCTGAAGGAACACCCAGGGCGCCACTTTCTGTCAAGGAGCCTGGACGATGCTCTGAAGCTG
ACCGAGCAGCCCGAACTGGCCAACAAAGTGGACATGGTGTGGATTGTGGGCGGGTCTAGTGTGTACAAGGAGGCC
ATGAATCACCCAGGCCATCTGAAACTGTTCTGACCCGGATCATGCAGGACTTTGAGAGCGATACATTCTTTCCC
GAGATTGACCTGAAAAAGTACAAACTGCTGCCTGAATATCCAGGCGTGCTGTCTGATGTGCAGGAGGAAAAGGGG
ATCAAGTACAAATTCGAGGTGTATGAGAAGAACGATTGA

Fig. 28