

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 424**

51 Int. Cl.:

|                     |           |                     |           |
|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
| <b>A61K 35/12</b>   | (2015.01) | <b>A61K 31/197</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 31/135</b>  | (2006.01) | <b>A61K 31/4245</b> | (2006.01) |
| <b>A61K 31/137</b>  | (2006.01) | <b>A61K 39/395</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 31/185</b>  | (2006.01) | <b>C07K 16/32</b>   | (2006.01) |
| <b>A61K 31/675</b>  | (2006.01) | <b>A61K 31/661</b>  | (2006.01) |
| <b>A61K 31/7076</b> | (2006.01) | <b>A61K 35/17</b>   | (2015.01) |
| <b>A61N 5/10</b>    | (2006.01) | <b>A61K 47/68</b>   | (2007.01) |
| <b>B82Y 5/00</b>    | (2011.01) | <b>A61K 48/00</b>   | (2006.01) |
| <b>C12N 5/0783</b>  | (2010.01) |                     |           |
| <b>A61K 31/196</b>  | (2006.01) |                     |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2011 PCT/US2011/035104**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11140170**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2011 E 11778231 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2566954**

54 Título: **Inmunoterapia con células alogénicas redireccionadas**

30 Prioridad:

**04.05.2010 US 331325 P**

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

**17.10.2018**

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.  
(100.0%)  
At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95  
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**ESHAR, ZELIG;  
MARCUS, ASSAF y  
WAKS, TOVA**

74 Agente/Representante:

**ANGOLOTI BENAVIDES, Joaquín**

**Observaciones:**

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

ES 2 686 424 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 con células alogénicas redireccionadas

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCampo de la invención

10 El objeto de la divulgación se encuentra en el campo de la bioquímica (inmunología) y la medicina y se refiere a la terapia de transferencia adoptiva que usa células alogénicas específicas tumorales.

Descripción de los antecedentes

15 La terapia celular adoptiva (ACT, por sus siglas en inglés) es un procedimiento en el que se administran linfocitos terapéuticos a los pacientes para tratar una infección viral o un cáncer [1, 2]. Este enfoque implica la generación *ex vivo* de linfocitos de células T específicas tumorales y su implantación en los pacientes. Además de la implantación de linfocitos, el huésped puede ser tratado de otras maneras que apoyan la toma de las células T y su respuesta inmune, por ejemplo, preacondicionamiento del huésped (con radiación o quimioterapia) y administración de factores de crecimiento de linfocitos (como IL-2) [1, 3, 4]. Existen muchos métodos para generar tales linfocitos específicos tumorales, siendo los dos enfoques principales la expansión de células T específicas de antígeno o la redirección de las células T mediante ingeniería genética [1, 5, 6]. El éxito más notable de la ACT se ha dado en el tratamiento del melanoma metastásico. En un ensayo clínico de referencia, Dudley *et al.* deplecionaron los linfocitos de pacientes con melanoma y luego les administraron linfocitos infiltrantes tumorales autólogos expandidos *ex vivo*, en concurrencia con IL-2 logrando respuestas objetivas en más del 50 % de los pacientes [7]. Estos resultados son superiores a todas las otras terapias dirigidas al melanoma metastásico, y es la única forma de inmunoterapia específica que se ha demostrado que confiere beneficio terapéutico [1].

30 Aunque los resultados observados en melanoma son muy impresionantes, los linfocitos infiltrantes tumorales (TIL, por sus siglas en inglés) solo pueden aislarse del melanoma o del cáncer renal y, por lo tanto, no pueden usarse como estrategia general para tratar el cáncer [1]. Se ha usado la modificación genética para redireccionar linfocitos contra tumores mediante el uso de cadenas TCR transgénicas o receptores quiméricos [1, 5, 6]. El laboratorio de los inventores ha sido pionero en el uso de receptores quiméricos basados en anticuerpos (receptores de antígenos quiméricos - CAR, por sus siglas en inglés) como un medio para redireccionar las células T ("el enfoque del cuerpo T") contra los antígenos tumorales [8]. El cuerpo T es una célula T regular que expresa un TCR y un receptor quimérico, y es capaz de ser activado por cualquiera de los dos receptores. El receptor quimérico original estaba compuesto por un fragmento scFv fusionado a una cadena gamma [9]. Se utilizó un receptor quimérico tripartita (TPCR, por sus siglas en inglés) de "segunda generación" que incluye un elemento de señalización adicional (por ejemplo, CD28 o CD137 o su combinación) y es capaz de activar linfocitos T vírgenes de manera independiente de la coestimulación, demostrando su superioridad sobre el TCR nativo [8]. La validez del enfoque del cuerpo T ha sido validada en numerosos modelos preclínicos, demostrando actividad contra tumores malignos hematológicos y tumores sólidos (incluyendo ovarios, próstata, mama, renales, colon, neuroblastoma y otros) [2, 5, 10]. Ha habido algunos ensayos clínicos iniciales que emplearon células T modificadas con CAR que no proporcionaron un beneficio terapéutico significativo, pero estos ensayos utilizaron principalmente CAR "de primera generación" (que carecen de motivos coestimuladores en el CR) y no incluyeron linfo-depleción previa de los pacientes [5, 10, 11]. En un ensayo clínico reciente y de referencia, Pule *et al.* muestran que los linfocitos CTL del EBV diseñados con un receptor quimérico específico de GD2 persisten más tiempo *in vivo* y proporcionan algún beneficio terapéutico contra el neuroblastoma, lo que demuestra el potencial del enfoque del "cuerpo T" [12].

50 A pesar de estos éxitos, la ACT tiene una desventaja importante: cada paciente recibe un tratamiento elaborado individualmente, usando los propios linfocitos de los pacientes, lo que limita la practicidad de la ACT debido a los considerables obstáculos técnicos y logísticos que debe enfrentar su aplicación. Lo ideal sería transformar la ACT en una terapia estandarizada en la que, de forma normalizada, se pudieran administrar a los pacientes células terapéuticas alogénicas "universales" listas para su uso. Por alogénico se entiende que las células se obtienen de individuos que pertenecen a la misma especie, pero son genéticamente diferentes. El problema con el uso de células alogénicas es de doble filo. En los huéspedes inmunocompetentes, las células alogénicas son rápidamente rechazadas, un proceso denominado reacción huésped contra injerto (HvG, por sus siglas en inglés) [13, 14]. En los huéspedes inmuno-incompetentes, las células alogénicas pueden superar el sistema inmune del huésped y causar daños graves e incluso la muerte, un proceso denominado enfermedad de injerto contra huésped (EICH o GvHD, por sus siglas en inglés) [13, 14]. Con el fin de afectar la terapia adoptiva usando células alogénicas, se tendrían que superar estos problemas.

60 La reacción HvG está mediada por células T, B y NK. Las células T pueden reconocer directamente las moléculas MHC alogénicas MHC (desajuste mayor de histocompatibilidad) o, alternativamente, pueden reconocer péptidos no propios (derivados de proteínas polimórficas extrañas) en el contexto de las moléculas MHC propias (reconocimiento

indirecto derivado de un desajuste menor de histocompatibilidad) [13, 14] Las células B pueden reconocer cualquier proteína extraña que se presente en la membrana celular (ya sean moléculas MHC extrañas u otras proteínas polimórficas) [15]. Además, las células B también pueden reconocer restos de carbohidratos extraños, a saber, los antígenos del grupo sanguíneo ABO (así como otros antígenos del grupo sanguíneo) [16]. No obstante, el desajuste del grupo sanguíneo puede evitarse fácilmente y, por lo general, no representa un problema. Las células NK reconocen las células alogénicas usando una estrategia completamente diferente denominada “*Missing Self*” (“pérdida de lo propio”) [17]. Las células NK poseen receptores capaces de reconocer las moléculas MHC propias de manera que, en presencia de células singénicas, se inhiben las células NK [17]. Es importante destacar que las células NK expresan estos receptores inhibidores de una manera variada, de modo que no todos los NK expresan todos los posibles receptores inhibidores [17]. El resultado de este patrón de expresión es que algunas células NK son capaces de “detectar” la ausencia de una sola molécula MHC [17]. De esta forma, las células T y NK se complementan entre sí, y la evasión de un tipo de célula invita al ataque de la otra.

La reacción GvHD solo se produce cuando la reacción HvG del huésped se ve afectada, generalmente en el contexto del trasplante alogénico de médula ósea, pero también en algunas condiciones experimentales, tales como el modelo de trasplante parental a F1 [13, 14]. Las células T alorreactivas del donante migran a los órganos linfáticos, proliferan ampliamente y luego salen y atacan los órganos periféricos [14]. El potencial para causar GvHD depende de dos factores principales: la capacidad de alcanzar los órganos linfáticos y el potencial de proliferación extensiva [14, 18]. La capacidad de alcanzar los ganglios linfáticos está determinada por la expresión de las moléculas linfoideas CD62L y CCR7 [19]. Estas moléculas se expresan mediante células T vírgenes y células T de memoria central (Tcm), pero no mediante células T de memoria efectora (Tem) [20-22]. De hecho, los estudios han demostrado que las Tem producen una GvHD mucho más débil que las células vírgenes o Tcm, y que el bloqueo de la entrada a los órganos linfáticos puede prevenir la GvHD [23].

Debido a los obstáculos que enfrenta la terapia adoptiva alogénica, las células alogénicas solo se han empleado en un puñado de estudios. Antes de la presente invención, los pocos estudios que emplearon ACT alogénica lo hicieron exclusivamente en el contexto del trasplante alogénico de médula ósea (alo-TMO). El preacondicionamiento para el alo-TMO extirpa el sistema inmune del huésped permitiendo el injerto de la médula ósea del donante. En este contexto, no hay respuesta HvG contra el donante original, y el principal problema con esta terapia es el desarrollo de GvHD (que puede ocurrir incluso si el huésped y el donante son compatibles con el MHC) [13, 14]. La primera aplicación exitosa de la ACT alogénica se logró mediante el uso de la infusión de linfocitos del donante (DLI, por sus siglas en inglés) en el tratamiento de LMC después de la alo-TMO [24-26]. Los linfocitos del donante infundidos atacan al tumor y son capaces de provocar la regresión tumoral [26]. Desafortunadamente, debido a la reactividad de GvH inherente de los linfocitos del donante, GvHD es un problema importante con DLI [24-26]. A partir de esa prueba inicial, se ha realizado un trabajo exhaustivo para determinar la dosis celular óptima y el régimen de acondicionamiento necesarios para una respuesta tumoral óptima no solo en la LMC, sino también en otros tumores malignos hematológicos [24, 25]. A pesar de estos muchos intentos repetidos, DLI no ha demostrado una eficacia significativa en otros tipos de tumores malignos hematológicos (LMA, LLA, LLC, etc.) en ensayos clínicos, por lo que este enfoque no constituye una estrategia general para atacar tumores [24, 25]. Desde entonces, ha habido muchos intentos de reemplazar las células no específicas usadas en DLI con células tumorales específicas. En un intento de reemplazar DLI con células tumorales específicas, Baker *et al.* desarrollaron un protocolo de cultivo que produce células con amplio reconocimiento tumoral (basado en el reconocimiento de NKG2D), denominadas células inducidas por citoquina (CIK, por sus siglas en inglés) [27-29]. Las células CIK se generan mediante un protocolo de cultivo extendido que implica una proliferación extensiva en presencia de IFN- $\gamma$  [27-29]. Estas células exhiben una amplia actividad tumoricida contra numerosas leucemias de manera independiente al MHC y, lo que es importante, causan mucho menos GvHD después del TMO alogénico de MHC incompatible que las células T frescas [27-29]. El cultivo prolongado requerido para generar estas células redujo su capacidad proliferativa en comparación con esplenocitos frescos, lo que explica al menos parcialmente el nivel más bajo de GvHD causado por estas células [28]. Si bien estos resultados son prometedores, este enfoque solo ha demostrado eficacia en el tratamiento de tumores malignos hematológicos y poca o ninguna eficacia contra tumores sólidos. Otra desventaja es que este enfoque y todos los demás enfoques publicados antes de la presente invención se basan en el alo-TMO anterior. Esta dependencia del alo-TMO es problemática por dos razones: en primer lugar, requiere una compatibilidad completa o casi completa del MHC; de lo contrario, el resultado es una GvHD abrumadora; en segundo lugar, si se encuentra un donante adecuado, el régimen de preacondicionamiento se asocia con una toxicidad y morbilidad considerables, lo que limita su uso en algunos pacientes (como pacientes de edad avanzada). Además, estos tratamientos solo son aplicables cuando las células se obtienen del donante original, lo que significa que cada paciente es tratado individualmente, anulando la posibilidad de un tratamiento estandarizado.

Recientemente se han publicado dos artículos que emplean ACT alogénica junto con TMO singénico. En el primer estudio, Boni *et al.* utilizaron esplenocitos haploidenticos de ratones con TCR transgénicos para tratar melanomas B16 ampliamente establecidos después de un intenso preacondicionamiento en combinación con TMO autólogo [30]. La razón detrás de este estudio fue que la mieloablación debe evitar completamente la reacción HvG permitiendo que las células T alogénicas ataquen el tumor, pero al mismo tiempo exponen al huésped al riesgo de GvHD. En este caso, el uso de células T transgénicas que expresan un TCR monoclonal impidió el desarrollo de

GvHD aguda, mientras que la implantación de células T de repertorio abierto sí causó GvHD aguda, demostrando que un TCR monoclonal puede poseer poca o ninguna alorreactividad [30]. El beneficio terapéutico con células alogénicas solo se observó cuando el huésped estaba completamente mieloablacionado con 9 gray, con poco o ningún beneficio a 5 gray, un hecho que los autores explicaron por la persistencia relativamente breve de las células alogénicas después de 5 gray de radiaciones (menos de 10 días) [30]. Es importante destacar que, si bien la radiación de 9 gray facilitó una mayor persistencia de las células alogénicas, sin embargo, proporcionó un beneficio inferior en comparación con las células singénicas que los autores atribuyeron al eventual rechazo de las células alogénicas por parte del huésped [30]. Además, el uso de células haploidénticas en este modelo, si bien es muy desafiante, no está a la altura de un modelo completamente desparejado, lo que significa que aún se necesita cierta compatibilidad entre el donante y el huésped, lo que impide utilizar este enfoque como terapia estandarizada.

En el segundo artículo, Zakrezewski *et al.* (grupo de Marcel van den Brink en colaboración con Michel Sadelain) desarrollaron un enfoque completamente novedoso que implica la adición de precursores de células T modificadas genéticamente a TMO singénico en un modelo de linfoma de células B residual mínimo [31]. Dado que los precursores de células T maduran en el timo del huésped, se someten a una selección negativa y pierden la reactividad de GvH, pero desafortunadamente la maduración en el timo también purga cualquier reactividad de GvL que posean [31]. La transducción con un receptor quimérico anti-CD 19 redirige las células T en maduración contra el linfoma residual, proporcionando una ventaja de supervivencia significativa pero modesta sin supervivientes a largo plazo [31].

Se ha demostrado que la ACT alogénica es exitosa cuando se practica después de un trasplante alogénico de médula ósea. La compatibilidad adecuada del MHC puede limitar la aparición de GvHD grave, pero desafortunadamente también limita la aplicabilidad de alo-TMO. Sin el trasplante alogénico de médula ósea, el sistema inmune del huésped eventualmente rechazará todas las células alogénicas transferidas, dependiendo la tasa de rechazo de la competencia inmune del huésped.

#### SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención es según se define en las reivindicaciones. La terapia celular adoptiva (ACT) de células T autólogas específicas tumorales ha surgido como un enfoque prometedor para el tratamiento de tumores, particularmente en el tratamiento de melanoma metastásico en pacientes. Una posible deficiencia en la amplia aplicación de este enfoque es que requiere el uso de las propias células de los pacientes. Un objetivo de la presente divulgación era encontrar una forma de permitir una terapia de transferencia adoptiva segura y efectiva usando células alogénicas específicas tumorales. El problema con la transferencia adoptiva de células alogénicas es que o bien serán rechazadas por el huésped (huésped vs. injerto, HvG) o bien que las células transferidas atacarán al huésped (injerto vs. huésped, GvH). El uso de células T alogénicas específicas tumorales redirigidas al receptor quimérico puede transformar la ACT de una terapia fabricada individualmente en una terapia estandarizada.

Por consiguiente, un objetivo de la presente divulgación es permitir una terapia adoptiva segura y efectiva usando células alogénicas total o parcialmente incompatibles sin recurrir al TMO, transformando así la transferencia adoptiva de una terapia fabricada individualmente en un tratamiento estandarizado.

Para lograr este objetivo, los inventores primero formularon la hipótesis de que las células T alogénicas redirigidas serán funcionalmente superiores a las células autólogas redirigidas o a las células alogénicas no redirigidas. La segunda hipótesis de los inventores fue que las células alogénicas "silenciadas" podían prolongar su persistencia *in vivo*. La tercera hipótesis de los inventores fue que la combinación de diferentes dosis de células con diversos niveles de precondicionamiento del huésped podría crear una ventana de tiempo terapéutico que permitiría a las células alogénicas tiempo suficiente para erradicar el tumor antes de ser rechazadas. Específicamente, los inventores trataron de probar si el aumento de la magnitud de la respuesta, mediante el aumento de la dosis celular o mediante un mayor precondicionamiento, podría compensar la persistencia limitada debido al eventual rechazo de las células, eludiendo así la necesidad de TMO. La cuarta hipótesis de los inventores fue que retrasar la egresión de las células del donante desde los ganglios linfáticos (LN) después de su transferencia adoptiva podría evitar la HvG y la GvHD al tiempo que aumentaría la respuesta antitumoral.

Por consiguiente, la invención se refiere al tratamiento del cáncer, y a las composiciones farmacéuticas para dicho tratamiento.

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la invención se entenderán mejor en relación con la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y los dibujos que las acompañan, tal como se expone a continuación.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A - ID: silenciamiento de HLA-I mediado por shRNA en 293 células. Se transfectaron 293 células con plásmidos de shRNA específicos para la región UTR β2M 3' (clones 172721, 221378, 218774 de Open

biosystems) así como un plásmido de control. Las células transfectadas se tiñeron con estreptavidina-FITC sola (línea negra) o el anticuerpo anti-HLA-I W6/32-biotina + estreptavidina-FITC juntos (línea gris claro (la curva más alta en cada uno de los gráficos)). Estreptavidina-FITC sola ( $\downarrow$ ) delineó el 0 % de expresión de HLA, mientras que estreptavidina-FITC junto con W6/32-biotina delinearon el 100 % de expresión de HLA ( $\blacktriangledown$ ). Los transfectantes shRNA son las líneas grises. Solo los clones 172721 y 221378 causan regulación descendente de HLA. Figura 1A - shRNA sin silenciamiento. Figura 1B - clon de shRNA 172721. Figura 1C - clon de shRNA 221378. Figura 1D - clon de shRNA 218774.

Figuras 2A - 2B: Regulación descendente de moléculas de HLA en células JY. Las células JY se infectaron con retrovectores que contenían shRNA para la región UTR  $\beta$ 2M 3' (igual que en la Figura 1). A continuación, las células JY se tiñeron con estreptavidina-FITC sola (línea negra) o el anticuerpo anti-HLA-I W6/32-biotina + estreptavidina-FITC juntos (línea gris claro). Estreptavidina-FITC sola delineó el 0 % de la expresión de HLA, mientras que estreptavidina-FITC junto con W6/32-biotina delinearon el 100 % de expresión de HLA. Los transfectantes shRNA (líneas grises) muestran una regulación descendente modesta. Figura 2A - clon de shRNA 172721. Figura 2B - clon de shRNA 221378.

Figuras 3A - 3B: Representación esquemática de proteínas de fusión. Figura 3A -- La región de codificación de  $\beta$ 2M sin el 3' UTR se fusiona con HLAG a través de un espaciador. Figura 3B -- La región extracelular de CTLA4 está directamente fusionada a una secuencia de señal GPI.

Figuras 4A - 4C: las proteínas de fusión se expresan en la superficie celular. Figura 4A -- Tinción de K562 (negro) y K562 transfectados con  $\beta$ 2M-HLAG (gris claro) con anticuerpo FITC-aHLAG Mem-G/ 9. Figura 4B -- Tinción de K562 (negro) y K562 transfectado con  $\beta$ 2M-HLAG (gris claro) con anticuerpo FITC-aHLA-I W6/32. Figura 4C -- Tinción de K562 (negro) y K562 transfectado con CTLA4<sub>Extracelular</sub>-GPI (gris claro) con anticuerpo FITC-CTLA4 BNI3.

Figuras 5A - 5F: las proteínas de fusión inhiben ligeramente la destrucción de NK. La inhibición de NK por HLAG- $\beta$ 2M y CTLA4<sub>Extracelular</sub>-GPI se midió en ensayos de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  de 4 horas. Fig. 5A -- HLAG- $\beta$ 2M (-■-) inhibe ligeramente la lisis de K562 (-◆) (línea más oscura) por NK92. Figura 5B -- HLAG- $\beta$ 2M (-■-) inhibe ligeramente la lisis de 721 (-◆) por NK92. Figura 5C -- HLAG- $\beta$ 2M (-■-) no inhibe la lisis de 721 (-◆) por YTS. Figura 5D -- CTLA4<sub>Extracelular</sub>-GPI (-■-) inhibe ligeramente la lisis de K562 (-◆) por NK92. Figura 5E -- CTLA4<sub>Extracelular</sub>-GPI (-■-) aumenta la lisis de K562 (-◆) por YTS. Figura 5F -- HLAG- $\beta$ 2M (-■-) inhibe ligeramente la lisis de K562 (-◆) por NK primario recién aislado.

Figuras 6A - 6D: GVHD en función de la dosis de celular y la dosis de radiación. Curvas de supervivencia de ratones Balb/c (n=6) después de la transferencia adoptiva de células T C57B1 de tipo salvaje activadas. Se radiaron los ratones Balb/c el día 0, y se les inyectaron iv células T C57B1 (en los días 1 y 3). La mortalidad solo ocurrió después de la radiación con 400 rads. Figura 6A -- Total de 25, 50 o 100 millones de células T transferidas después de la radiación con 100 rads. Sin GVHD. Figura 6B -- Total de 25, 50 o 100 millones de células T transferidas después de la radiación con 200 rads. Sin GVHD. Figura 6C -- Total de 30, 50 o 100 millones de células T transferidas después de la radiación con 400 rads. GVHD en todas las dosis excepto en 30 millones. Figura 6D -- Total de 25, 50 o 100 millones de células T transferidas después de la radiación con 200 rads. Se monitorizó a los ratones para ver si perdían peso. Solo hubo pérdida de peso después de la transferencia de 100 millones de células T.

Figuras 7A-7E: modelo de tumor Renca-erbB2. Figura 7A: construcciones transgénicas del receptor quimérico. Las construcciones usadas para generar los ratones transgénicos se colocaron bajo el control del promotor/potenciador de CD2 humano que dirige la expresión solo en las células T y NK. CYT indica dominio citoplasmático; H, dominio de bisagra; L, guía de inmunoglobulina; LCR, región de control de locus; P, promotor; pL, secuencia de plásmidos; TM, dominio transmembrana; V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, dominios variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, respectivamente. Figura 7B -- Presentación esquemática de los receptores quiméricos específicos de HER2. El CR específico de HER2 abarca un scFv derivado del mAb anti-HER2, N29. En la configuración tripartita, el scFv se une en tándem a una porción corta de CD28 (que carece del sitio de unión al ligando) del dominio extracelular e incluye los dominios transmembrana y citoplasmáticos fusionados al dominio ITAM FcRy. Figura 7C -- Esquema experimental del tratamiento. Figura 7D -- Renca es resistente a la radiación. Curvas de supervivencia de ratones portadores de Renca-erbB2 no radiados, y ratones radiados con 200 y 400 rads el día 7 después de la inoculación del tumor - no se observaron diferencias (n=6). Figura 7E -- Histología pulmonar de ratones portadores de tumores el día 8, un día después de la radiación con 200 rads.

Figuras 8A - 8B: Los cuerpos T alogénicos son superiores a las células T alogénicas de tipo salvaje en ensayos funcionales contra un tumor *in vitro*. Figura 8A -- Las células Renca-erbB2- Luciferasa se coinubaron con cuerpos T alogénicos activados (Black-N29) o células T alogénicas (Black) en el efector indicado para alcanzar las proporciones en placas de 24 pocillos. Después de 24 horas, se midió la emisión de luciferasa desde la placa. El % de matanza se midió como = 100 - (señal de luciferasa del pocillo de matanza) / (señal de luciferasa del pocillo de control). Figura 8B -- Las células Renca-erbB2-Luciferasa se coinubaron con cuerpos T alogénicos activados (Black-N29) o células T alogénicas (Black) en 96 placas de pocillos planos. Después de 24 horas, se añadió H<sup>3</sup> timidina a los pocillos, y se midió la incorporación de timidina a las 48 horas.

Figura 9: La transferencia adoptiva de células T Balb-N29 extiende la supervivencia de Balb/c con metástasis pulmonares Renca-erbB2. Se inocularon ratones Balb/c (n= 6) con 10<sup>5</sup> células Renca-erbB2 iv el día 1, se radiaron el día 7 con 200 rads y luego se inyectaron con 10 millones de células T los días 8, 10 y 12 (así como 1000u de IL-2 dos veces al día los días 8-18). Los resultados representan un experimento de cada dos. Las

células Balb-N29 proporcionan un beneficio terapéutico significativo en comparación con el grupo de control ( $P < 0,0002$ ), mientras que C57B1 de tipo salvaje no proporciona ninguna y C57B1-N29 solo proporciona un beneficio marginal (aumento de la mediana a 62 días en comparación con 50 para el grupo de control).

Figuras 10A - 10B: los cuerpos T alogénicos proporcionan un beneficio terapéutico superior en comparación con

las células T alogénicas contra un tumor en ACT. Ratones Balb/c ( $n=6$ ) se inocularon (iv) con  $10^5$  células Renca-erbb2, y se radiaron el día 7. Los resultados representan un experimento de cada dos. Figura 10A -- dosis de radiación: 200 rads. Dosis de células T:  $10^8$  millones divididos en 2 dosis iguales en los días 8 y 10. Las medianas para C57B1-N29, C57B1 y los grupos de control son: 155, 70 y 43 días, respectivamente. C57B1-N29 es superior al C57B1 de tipo salvaje ( $P < 0,004$ ) que es superior al grupo de control ( $P < 0,0015$ ). Figura 10B -- Dosis de radiación: 400 rads. Dosis de células T: 30 millones divididos en 3 dosis iguales en los días 8, 10 y 12. Las medianas para C57B1-N29, C57B1 y los grupos de control son: 110, 24 y 50 días, respectivamente. C57B1-N29 extiende significativamente la supervivencia en comparación con C57B1 y los grupos de control ( $P < 0,002$ ).

Figuras 11A - 11C: los cuerpos T alogénicos transgénicos proporcionan un beneficio comparable a los cuerpos T

singénicos transgénicos. Ratones Balb/c ( $n=6$ ) se inocularon (iv) con  $10^5$  células Renca-erbb2, y se radiaron el día 7. Los resultados representan un experimento de cada dos. Figura 11A -- Dosis de radiación: 200 rads. Dosis de células T:  $10^8$  millones divididos en 2 dosis iguales en los días 8 y 10. Las medianas para Balb-N29, C57B1-N29 y los grupos de control son: 165, 155 y 43 días, respectivamente. Balb-N29 y C57B1-N29 prolongan la supervivencia en un grado similar ( $P=0,68$ ) y ambos son superiores al grupo de control ( $P < 0,0015$ ). Figura 11B -- Dosis de radiación: 400 rads. Dosis de células T: 30 millones divididos en 3 dosis iguales en los días 8, 10 y 12. Las medianas para Balb-N29, C57B1-N29 y los grupos de control son: 90, 110 y 50 días, respectivamente. C57B1-N29 extiende la supervivencia un poco más que Balb-N29 (pero no alcanza significación estadística), y ambos son mejores que el grupo de control ( $P < 0,002$ ).

Figura 11C -- Comparación de los dos regímenes usando células C57B1-N29 (radiación con 200 rads y transferencia de 100 millones de células frente a radiación con 400 rads y transferencia de 30 millones de células). Las medianas para los regímenes 200/100, 400/30 y el grupo de control fueron 150, 110 y 50 días, respectivamente. El régimen 200/100 prolonga la supervivencia en mayor medida que el régimen de 400/30, pero los resultados no alcanzan la significación estadística.

Figuras 12A - 12D: Células transducidas tan eficaces como las células transgénicas en el tratamiento del tumor.

Ratones Balb/c ( $n=6$ ) se inocularon (IV) con  $10^5$  células Renca-erbb2 y se radiaron con 200 rads el día 7. Los ratones se dejaron sin tratar o fueron inyectados con células T transgénicas N29 o transducidas de cualquiera de los dos grupos Balb/c o C57B1 de fondo, así como un control alogénico simulado C57B1 transfectado (control, C57B1 simulado, C57B1-N29 transgénico + C57B1 tipo salvaje, C57B1-N29 transducido, Balb-N29 transgénico + Balb/c tipo salvaje, Balb-N29 transducido). A diferencia de otros experimentos, esta vez los esplenocitos fueron activados por aCD3/CD28. Figura 12A -- Eficiencia de transducción de C57B1 con el receptor quimérico N29 evaluado por el informador de GFP en el mismo plásmido. Figura 12B -- Eficiencia de transducción de Balb/c con el receptor quimérico N29 evaluado por el informador de GFP en el mismo plásmido. Figura 12C -- Comparación entre células T alogénicas C57B1 no tratadas (50 días), células T alogénicas C57B1 con transducción simulada (71 días), C57B1-N29 transducidas (mediana no alcanzada) y Balb-N29 transducidas (106 días). Las medianas para el grupo se indican entre paréntesis. Figura 12D -- Comparación entre C57B1-N29 transducido, C57B1-N29 transgénico + C57B1 de tipo salvaje, Balb-N29 transducido, Balb-N29 transgénico + Balb de tipo salvaje. La dosis de células transgénicas se ajustó de modo que se inyectara exactamente el mismo número de cuerpos T, independientemente de que fueran de origen transgénico o transducido. Se añadieron esplenocitos activados de tipo salvaje (C57B1 o Balb/c) a los esplenocitos transgénicos, de modo que el número total fuera igual a la dosis celular transducida (100 millones de células).

Figuras 13A a 13B: la ciclofosfamida puede reemplazar a la TBI como precondicionamiento, y permite un

tratamiento eficaz a una dosis celular inferior. Se inocularon ratones Balb/c ( $n = 6$ ) (IV) con  $10^5$  células Renca-erbb2, y se les inyectó 200 mg/kg de ciclofosfamida ip el día 7. A los ratones tratados se les inyectaron  $10^7$  células T activadas (transducidas o no, alogénicas o singénicas) en los días 8 y 10. Se usaron las mismas células para estos experimentos y los experimentos descritos en la Figura 10. Figura 13A-- Comparación entre no tratadas (71 días), células T alogénicas C57B1 con transducción simulada (100 días), C57B1-N29 transducidas (mediana no alcanzada) y Balb-N29 transducidas (120,5 días). Las medianas para el grupo se indican entre paréntesis. Figura 13B -- Comparación entre C57B1-N29 transducido, C57B1-N29 transgénico + C57B1 de tipo salvaje, Balb-N29 transducido, Balb-N29 transgénico + Balb de tipo salvaje. La dosis de células transgénicas se ajustó de modo que se inyectara exactamente el mismo número de cuerpos T, independientemente de que fueran de origen transgénico o transducido. Se añadieron esplenocitos activados de tipo salvaje (de origen C57B1 o Balb/c) a los esplenocitos transgénicos, de modo que el número total fuera igual a la dosis celular transducida (20 millones de células inyectadas por ratón en total).

Figuras 14A a 14H: La terapia alogénica es segura. Se radiaron ratones Balb/c con 200 rads y se les inyectaron

100 millones de células T C57B1 activadas 1 y 3 días después. Los ratones se sacrificaron los días 4 y 6, sus órganos se tiñeron con hematoxilina y eosina y se analizaron para determinar la GvHD. Figura 14A -- Pulmón en el día 4 que muestra histología normal. Figura 14B -- Hígado en el día 4 que muestra histología normal. Figura 14C -- Intestino en el día 4 que muestra histología normal. Figura 14D -- Riñón en el día 4 que muestra histología normal. Figura 14E -- Pulmón en el día 6 que muestra histología normal con infiltración linfocítica menor (L). Figura 14F -- Hígado en el día 6 que muestra histología normal con infiltración linfocítica menor (L). Figura 14G --

Intestino en el día 6 que muestra histología normal con infiltración linfocítica menor (L). Figura 14H -- Riñón en el día 6 que muestra histología normal.

Figuras 15: Las células de tipo salvaje de diferentes cepas pueden prolongar la supervivencia de los ratones portadores de tumores. Se inocularon ratones Balb/b (n=6) con  $10^5$  Renca-erbb2 IV, y luego se radiaron con 200 rads 7 días después. En los días 8 y 10, los ratones fueron inyectados con células T activadas C57B1, C3H o FVB (50 millones de células en cada dosis). C57B1, C3H y FVB aumentan la supervivencia de los ratones en comparación con el grupo de control ( $P < 0,0004$  para todos los grupos en comparación con el grupo de control, pero sin diferencias significativas entre ellos).

Figura 16: Persistencia de células FVB-Luciferasa transferidas adoptivamente. Se inyectaron ratones Balb/c con  $10^5$  células Renca-erbb2 iv, y luego se radiaron con 200 rads el día 7. Luego los ratones fueron inyectados con 50 millones de células T FVB-Luc iv 1 y 3 días después de la radiación. Los ratones fueron examinados por IVIS, comenzando el día después de la segunda inyección (Día 3). Cada ratón fue numerado y seguido individualmente. La figura de fondo muestra ratones no inyectados con células FVB-Luc.

Figuras 17A - 17C: Localización de células FVB-Luciferasa transferidas adoptivamente. Ratones Balb/c (n=3) fueron radiados con 200 rads, y luego inyectados con 50 millones de células FVB-Luc IV al día siguiente. Un día después, ratones enteros y órganos específicos fueron examinados por IVIS. Las imágenes son de un ratón representativo. Figura 17A -- Imagen tomada del ratón entero. Figura 17B -- Imagen tomada de los órganos del ratón. Figura 17C -- PE-Cy7-CD62L y FITC-CD44 se usaron para teñir esplenocitos que se activaron durante 48 horas con CD3/CD28, y luego se cultivaron en 200u/ml de IL-2 durante 5 días.

Figuras 18A - 18B: FTY720 previene GvHD, y al mismo tiempo amplía la supervivencia de ratones portadores de tumores. Balb/c (n=6) se inocularon con  $10^5$  células Renca-erbb2 IV el día 1. Algunos grupos recibieron inyecciones diarias de FTY720 en los días 8-18 (ip, 0,3mg/kg). La muerte antes del día 45 como se ve en (A) se debe a GvHD, que se distingue fácilmente de la muerte debida al tumor (la muerte asociada a GvHD tenía las siguientes características: caquexia, postura encorvada, cirrosis hepática). Los resultados representan uno de dos experimentos. Figura 18A -- Los ratones se radiaron con 400 rads y luego se dejaron sin tratar o se inyectaron con  $10^7$  células T los días 8, 10 y 12 cada uno ( $30 \times 10^6$  en total). Las células T eran de origen C57B1, C57B1-N29, Balb-N29. Cada tratamiento se realizó solo o con FTY720. Figura 18B: los ratones se radiaron con 200 rads y luego se dejaron sin tratar o se inyectaron con  $50 \times 10^6$  células T los días 8 y 10 ( $10^8$  en total). Las células T eran de C57B1, C57B1-N29 o Balb-N29. Cada tratamiento se realizó solo o con FTY720.

Figuras 19A - 19C: Dinámica de la respuesta del cuerpo T tumoral específico *in vivo*. La respuesta del cuerpo T tumoral específico fue rastreada mediante la transferencia de cuerpos T que expresan luciferasa y monitorizando la bioluminiscencia en el IVIS. Figura 19A -- Se inocularon Balb/c (n=6) con  $10^5$  células Renca-erbb2 IV el día 1, se radiaron con 200 rads el día 7, y se inyectaron con  $50 \times 10^6$  de cuerpos T que expresan Luciferasa (bien singénicos Balb-N29 o alogénicos Black-N29) los días 8 y 10. Figura 19B -- Balb/c (n=6) se inocularon con  $10^5$  células Renca-erbb2 IV el día 1, se radiaron con 400 rads el día 7 y se inyectaron con  $15 \times 10^6$  de cuerpos T que expresan luciferasa (bien singénicos Balb-N29 o alogénicos Black-N29) los días 8 y 10. Figura 19C -- Se midió la bioluminiscencia total del ratón entero de cada uno de los grupos. El gráfico muestra el flujo total promedio (así como la desviación estándar) de los ratones en cada grupo.

Figuras 20A - 20B: La prevención de la egrésión de FTY720 prolonga la supervivencia *in vivo* de los cuerpos T alogénicos transferidos de forma adoptiva. La respuesta del cuerpo T tumoral específico fue rastreada mediante la transferencia de cuerpos T que expresan Luciferasa y monitorizando la bioluminiscencia en el IVIS. La Figura 20A -- Balb/c (n=6) se inocularon con  $10^5$  células Renca-erbb2 IV el día 1, se radiaron con 400 rads el día 7, y se inyectaron con  $15 \times 10^6$  cuerpos T Black-N29 que expresan Luciferasa en los días 8 y 10. En uno de los grupos 0,3mg/kg FTY720 fue inyectado ip diariamente los días 8-18. Figura 20B -- se midió la bioluminiscencia total del ratón entero de cada uno de los grupos. El gráfico muestra el flujo total promedio (así como la desviación estándar) de los ratones en cada grupo.

Figura 21: Ilustración esquemática de la configuración experimental. A los ratones se les inyectó  $10^5$  Renca-Her2/Neu por vía intravenosa el día 0. El día 7, los ratones se radiaron con 200 o 400 rads de radiación corporal total (TBI). Una dosis dividida de cuerpos T (transducidos con CAR Her2/neu-específico o aislados de ratones transgénicos que expresan dicho CAR) se administró en los días 8 y 10. El receptor de antígeno quimérico (CAR) se compone de un scFv fusionado a los dominios de señalización CD28 y FcRy. Los cuerpos T eran el fondo C57BL/6 (alogénico) o Balb/c (singénico).

Figuras 22a-22d: El equilibrio entre el precondicionamiento del huésped y la dosis celular transferida determina el beneficio antitumoral proporcionado por los cuerpos T alogénicos. Parcelas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones portadores de Renca-Her2/Neu. Los ratones (n=12/grupo) se radiaron y luego se dejaron sin tratar como control (diamantes), o se les administraron sistémicamente cuerpos T singénicos (Balb-N29, cuadrados) o cuerpos T alogénicos (Black-N29, triángulos). Los resultados que se muestran se agrupan a partir de dos experimentos independientes. Los valores P se calcularon para cada experimento por separado usando la prueba log-rank, y se combinaron usando el método de Fisher. (Figura 22a) El protocolo consistió en radiación de 200 rad y  $30 \times 10^6$  cuerpos T (200R/30). Balb-N29 o Black-N29 vs. control  $P = 0,000004$ . (Figura 22b) El protocolo consistió en radiación de 200 rad y  $100 \times 10^6$  cuerpos T (200R/100). Balb-N29 o Black-N29 vs. control  $P = 0,000004$ . (Figura 22c). El protocolo consistió en radiación de 400 rad y  $30 \times 10^6$  cuerpos T (400R/30). Balb-N29 o Black-N29 vs. control  $P = 0,000004$ . (Figura 22d) El protocolo consistió en radiación de 400 rad y  $100 \times 10^6$

cuerpos T (400R/100). Balb-N29 vs. control  $P = 0,000004$ . El grupo Black-N29 murió por GvHD, que se manifestó por caquexia grave e hipoplasia linfoide. No se muestran los datos.

Figura 23. Tanto el receptor quimérico basado en anticuerpos como la alorreactividad basada en TCR aumentan la respuesta antitumoral. Parcelas de supervivencia de Kaplan-Meyer de ratones portadores de Renca-Her2/Neu.

Los ratones ( $n=6$ /grupo) se radiaron con 200 rads y 1 día después o bien se dejaron sin tratar como control (diamante) o se inyectaron con  $100 \times 10^6$  células T. Las poblaciones de células T utilizadas fueron: células T transducidas alogénicas simuladas (Black, triángulos negros vacíos,  $P=0,0011$  versus control), células T singénicas transducidas con el N29 CAR (Balb-N29 Ts, cuadrados rellenos), células T alogénicas transducidas con el N29 CAR (Black-N29 Ts, triángulos rellenos,  $P=0,0005$  versus Black,  $P=0,012$  versus Balb-N29), células T singénicas de ratones Balb/c transgénicos N29 (Balb-N29 Tg, cuadrados abiertos, sin diferencia significativa vista frente a las células transducidas), células T alogénicas de ratones C57BL/6 transgénicos N29 (C57BL-N29 Tg, triángulos abiertos, no se observaron diferencias significativas frente a las células transducidas).

Figuras 24a-24d. La alorreactividad modula la migración y la persistencia de las células alogénicas. (Figura 24a)

Imágenes comparativas de bioluminiscencia *in vivo* de ratones portadores de Renca-Her2/neu ( $n=6$ /grupo) tratados con cuerpos T singénicos (Balb-N29) o alogénicos (Black-N29) según diferentes protocolos, como se indica. Las imágenes de bioluminiscencia (BLI) se realizaron con dos animales por adquisición para evitar la interferencia de fuentes de fotones fuertes con áreas cercanas. Las imágenes mostradas son de tres ratones representativos por grupo. 200R/30 = radiación con 200 rads y  $30 \times 10^6$  cuerpos T. 200R/100 = radiación con 200 rads y  $100 \times 10^6$  cuerpos T. 400R/30 = radiación con 400 rads y  $30 \times 10^6$  cuerpos T. (Figura 24b)

Intensidades de señal BLI del cuerpo entero a partir de imágenes secuenciales cada 3-4 días después de la transferencia de células T durante un período de 20 días. Cada línea representa un solo animal. Se analizaron las diferencias por parejas entre los grupos mediante la prueba de Mann-Whitney.  $P=0,005$  para Black-N29 vs. Balb-N29 usando el protocolo 200R/100 el día 1.  $P=0,005$  para Black-N29 vs. Balb-N29 usando el protocolo 400R/30 el día 7.  $P=0,002$  para Black-N29 vs. Balb-N29 usando el protocolo 400R/30 el día 14. (Figura 24c)

Los cuerpos T marcados con CFSE se transfirieron a ratones portadores de tumores de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente. Los ratones se sacrificaron 4 días después de la transferencia, y se recogieron esplenocitos. Los esplenocitos se tiñeron con un anticuerpo antiidiotípico para identificar los cuerpos T de los donantes (no se muestra), y se muestra la tinción con CFSE para los cuerpos T transferidos. (Figura 24d) Los esplenocitos de ratones tratados con cuerpos T alogénicos usando el protocolo 400R/30 se bloquearon en células  $CD3^+$  y se analizaron para determinar la expresión de CFSE frente a CD62L. Los datos muestran una diferenciación progresiva (pérdida de CD62L) concomitante con la proliferación (pérdida de CFSE),  $P=0,0001$  usando la prueba de chi-cuadrado.

Figuras 25a-25i. FTY720 aumenta la terapia adoptiva alogénica pero no singénica. (Figura 25a)

Parcelas de supervivencia de Kaplan-Meyer de ratones portadores de Renca-Her2/Neu. Los ratones ( $n=12$ /grupo) se radiaron con 400 rads, y 1 día más tarde o bien se dejaron sin tratar como control (diamante), o se inyectaron con  $30 \times 10^6$  cuerpos T transgénicos. Algunos grupos recibieron FTY720 0,3mg/kg ip durante 10 días después de la transferencia. Las células T fueron: cuerpos T singénicos (Balb-N29, cuadrados), cuerpos T singénicos con FTY720 (Balb-N29, cuadrados grises que se muestran en la parte inferior derecha), cuerpos T alogénicos (Black-N29, triángulos marrones que se muestran en la parte inferior derecha), cuerpos T alogénicos con FTY720 (Black-N29, triángulos oliva que se muestra en la esquina superior derecha, Black-N29+FTY720 vs. Black-N29,  $P=0,013$ ).

Los valores P se calcularon por separado para cada experimento usando la prueba log rank y se combinaron usando el método de Fisher. (Figura 25b). BLI *in vivo* comparativo de ratones portadores de Renca-Her2/neu ( $n=6$ /grupo) radiados con 400 rads, y tratados con cuerpos T  $30 \times 10^6$  singénicos (Balb-N29) o alogénicos (Black-N29). BLI se realizó como en la Figura 24a. (Figura 25c)

Intensidades de la señal BLI de cuerpo entero a partir de imágenes secuenciales cada 3-4 días después de la transferencia de células T durante un período de 20 días. Cada línea representa un animal. (Figura 25d) Se definió una región de interés alrededor de los bazo de ratones de la Figura 25b. Se muestran los recuentos de fotones absolutos de ratones tratados con cuerpos T alogénicos con o sin FTY720. Se muestran las medias y el SEM. (Figura 25e)

Se aislaron células mononucleares 4 días después de la transferencia adoptiva de la sangre de ratones portadores de tumores tratados con cuerpos T alogénicos con o sin FTY720, y se cuantificó el número de células T en la sangre mediante tinción para CD3. Se muestran las medias y el SEM. (Figura 25 f) Los esplenocitos de ratones portadores de tumores tratados con cuerpos T alogénicos con o sin FTY720 se tiñeron 4 días después de la transferencia adoptiva con anti-H2K<sup>b</sup> para identificar los cuerpos T alogénicos. Se muestran las medias y el SEM. (Figura 25g)

Se tiñeron esplenocitos de ratones portadores de tumores tratados con cuerpos T alogénicos con o sin FTY720 7 días después de la transferencia adoptiva con anti-H2K<sup>b</sup> con el fin de identificar los cuerpos T alogénicos. Se muestran las medias y el SEM. (Figura 25i)

Parcelas de supervivencia de Kaplan-Meyer de ratones portadores de Renca-Her2/Neu. Los ratones ( $n=6$ /grupo) se radiaron con 400 rads y 1 día más tarde o bien se dejaron sin tratar como control (diamante), o se inyectaron con cuerpos T alogénicos  $100 \times 10^6$  ya sea con (triángulos mostrados a la izquierda) o sin FTY720 (triángulos mostrados a la derecha).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Algunas abreviaturas comunes utilizadas a lo largo de todo el documento son las siguientes:

**ACT:** Terapia Celular Adoptiva  
**FCS:** suero fetal bovino  
**DMEM:** medio de águila modificada de Dubbelco  
**PBS:** solución tamponada de fosfato  
**GFP:** Proteína Fluorescente Verde  
**ShRNA:** ARN de horquilla corta  
**UTR:** región no traducida  
**i.v.:** intravenoso  
**i.p.:** intraperitoneal  
**scFv:** fragmento variable de cadena simple  
**CR:** receptor quimérico  
**CAR:** receptor de antígeno quimérico  
**TPCR:** receptor quimérico tripartito  
**TMO:** trasplante de médula ósea  
**Alo-TMO:** TMO alogénico  
**Auto-TMO:** TMO autólogo o singénico  
**HvG:** huésped vs. injerto  
**GvH (D):** injerto vs. huésped (enfermedad)  
**GvL:** injerto vs. leucemia  
**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad  
**APC:** célula presentadora de antígeno  
**NK:** asesino natural  
**LMC:** leucemia mieloide crónica  
**DLI:** implantación de linfocitos de donante  
**CIK:** asesino inducido por citoquinas  
**TBI:** radiación corporal total  
**CTL:** linfocito T citotóxico  
**TIL:** linfocito infiltrante tumoral  
**Tcm:** célula T de memoria central  
**Tem:** célula T de memoria efectora  
**Tscm:** célula madre T de memoria  
**WT:** tipo salvaje  
**LN:** ganglio linfático

Al tiempo de la divulgación, los inventores han desarrollado una terapia adoptiva alogénica segura y eficaz para el tratamiento del cáncer. La presente invención proporciona una prueba de concepto para la terapia adoptiva alogénica con un buen perfil de seguridad que es tan eficaz como la terapia adoptiva singénica, al tiempo que evita el uso de TMO al:

- (1) "Silenciar" las células efectoras T por regulación descendente de las clases I y II usando shRNA, evitando al mismo tiempo la muerte mediada por NK mediante la expresión de un ligando inhibidor de NK.
- (2) Encontrar los regímenes de transferencia adoptiva más poderosos que no inducen GvHD y evitan el TMO.
- (3) Comparar el beneficio terapéutico de las células alogénicas transgénicas redirigidas por receptores quiméricos (CR-Tg) en oposición a las células singénicas CR-Tg, y las células alogénicas no modificadas.
- (4) Demostrar la seguridad de la terapia adoptiva alogénica.
- (5) Estudiar la dinámica de la respuesta alogénica del cuerpo T que incluye los patrones de anidamiento y la persistencia *in vivo* de células transferidas adoptivamente.
- (6) Estudiar cómo la adición de FTY720 modula la respuesta de injerto contra huésped y la respuesta antitumoral.

Para lograr su objetivo, los inventores investigaron si las células alogénicas "silenciadas" podrían prolongar su persistencia *in vivo* y reducir el rechazo de las células alogénicas (es decir, la segunda hipótesis indicada anteriormente). El "silenciamiento" se logró silenciando la expresión de moléculas de MHC (usando shRNA) y expresando simultáneamente un ligando inhibidor para células NK en las células transferidas. El silenciamiento de MHC puede impedir el reconocimiento y la eliminación de las células alogénicas por parte de las células T, pero al mismo tiempo las hace susceptibles al ataque de NK ("missing self"), que es la razón por la que se necesita un ligando inhibidor adicional. Aunque fue un tanto exitoso, el enfoque del "silenciamiento", por sí solo, no protegió suficientemente a las células del ataque alogénico; por lo tanto, se desarrolló una estrategia alternativa, como se analiza a continuación. Sin embargo, el "silenciamiento" es una opción que puede aumentar la eficacia de la respuesta antitumoral al reducir HvGD, cuando se usa en combinación con una o más de las estrategias alternativas que se analizan a continuación.

En segundo lugar, los inventores combinaron diferentes dosis celulares con diversos niveles de preconditionamiento del huésped para crear una ventana de tiempo terapéutico en la que retrasar el rechazo de

las células alogénicas (es decir, la tercera hipótesis indicada anteriormente). Específicamente, los inventores probaron si el aumento de la magnitud de la respuesta, a través del aumento de la dosis celular, podría compensar la menor persistencia debido a la reducción del precondicionamiento del huésped, eludiendo así la necesidad de TMO.

5 En este enfoque, los inventores manipularon el huésped para permitir células T alogénicas tumorales específicas “no silenciadas” que expresan receptores quiméricos basados en anticuerpos (cuerpos T) para ejecutar su función antitumoral. Un camino directo para mejorar la persistencia de las células alogénicas es linfodeplecionar al huésped usando radiación o quimioterapia (una estrategia también utilizada en la terapia adoptiva singénica para superar el control homeostático y crear un nicho para las células injertadas). La linfodepleción deteriora el sistema inmunitario del huésped, retrasando así el rechazo de las células alogénicas, creando de hecho una ventana de tiempo terapéutico en la que las células alogénicas pueden actuar. El problema con la ablación del sistema inmune del huésped es el aumento del riesgo de GvHD asociado con la incompetencia inmune. En la presente divulgación, los inventores muestran que, bajo ciertos regímenes de terapia adoptiva alogénica, los cuerpos T específicos de HER2 (células T que se redirigen a través de un receptor quimérico específico de HER2) pueden prolongar significativamente la supervivencia e incluso curar algunos ratones, en un modelo murino de las micrometástasis pulmonares de cáncer renal HER2<sup>+</sup> (simulando el ajuste mínimo de la enfermedad residual clínicamente relevante). Los cuerpos T alogénicos proporcionan un beneficio terapéutico comparable a los cuerpos T singénicos, y son muy superiores a las células T alogénicas no específicas. Es importante destacar que la terapia alogénica fue segura, sin mortalidad, y con solo una pérdida de peso transitoria (de hasta el 10 %). El análisis histológico reveló que los tejidos periféricos sufrieron poco o ningún daño a pesar de la infiltración linfocítica esporádica.

En otro enfoque, los inventores establecieron una manera de retrasar la egresión de las células del donante desde los ganglios linfáticos después de su transferencia adoptiva para prevenir la GvHD sin alterar la respuesta antitumoral (es decir, la cuarta hipótesis señalada anteriormente). En un intento de mejorar la terapia alogénica, bajo este enfoque, los inventores exploraron el uso de un inhibidor de la salida de linfocitos, por ejemplo, FTY720, una sustancia conocida por atrapar los linfocitos en los ganglios linfáticos. Se supuso que la aplicación temporal de FTY720 podría mitigar la respuesta de GvHD, y que la mejora de la respuesta de GvHD podría permitir el uso de protocolos de transferencia adoptiva más potentes, lo que en última instancia permitiría una mayor eficacia. De hecho, la incorporación de FTY720 en el protocolo de tratamiento inhibió simultáneamente la GvHD y produjo los mejores resultados terapéuticos de todos los protocolos probados. La obtención de imágenes *in vivo* muestra que la prevención de la salida de linfocitos mediante la administración de un compuesto tal como FTY720 de hecho prolonga la supervivencia *in vivo* de los cuerpos T alogénicos. Es importante destacar que, al usar este régimen, las células alogénicas mostraron una eficacia terapéutica superior a las células singénicas, demostrando que la terapia adoptiva alogénica puede ser una alternativa atractiva a la terapia adoptiva singénica, no solo por los obvios beneficios logísticos, sino también porque puede ser más efectiva. Como tal, la administración de FTY720 (o cualquier otro inhibidor de la salida de linfocitos) puede aumentar la respuesta antitumoral. Además, los inventores han descubierto que FTY720 atrapa tanto los linfocitos del huésped como los linfocitos alogénicos que se transfirieron (“trasplantaron”) al huésped. Si bien los inventores creen que atrapar los linfocitos alogénicos con los linfocitos del huésped puede hacer que los linfocitos alogénicos ataquen a los linfocitos del huésped atrapados, retrasando así su propio rechazo por HvG, esto es solo una teoría. Los inventores, sin embargo, no desean estar vinculados por ninguna teoría en particular. El inhibidor de la salida de linfocitos se administra de modo que sea concomitante con el período de actividad de las células T quiméricas alogénicas.

45 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a métodos de tratamiento y/o prevención de enfermedades, tales como cáncer, y a las composiciones farmacéuticas para dicho tratamiento.

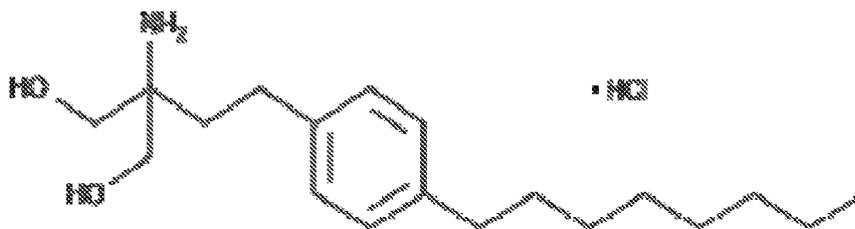
Una realización de la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad, tal como cáncer, que comprende administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad efectiva de células T alogénicas, tales como células T alogénicas con un receptor quimérico no restringido de MHC. La combinación de células T alogénicas con un receptor quimérico no restringido de MHC produce “células efectoras universales” para el uso de una terapia estándar contra el cáncer. A este respecto, los cuerpos T pueden usarse como “células efectoras universales” porque el CR es MHC sin restricciones; en cambio, las células T (incluso las células T transducidas con TCR) están restringidas por MHC y, por lo tanto, no son universales.

55 En otra realización, las células T alogénicas son células T alogénicas redirigidas por receptor quimérico. En este sentido, las células T deberían expresar un receptor quimérico. Las células T pueden ser cualquier célula T con un receptor quimérico que incluya un Ab de cadena única específico tumoral u otro ligando específico tumoral como parte de su dominio extracelular. Ejemplos de tales células conocidas que expresan receptores quiméricos y el ADN quimérico se divulgan en el documento WO1993/019163 de Eshhar *et al.* y la Patente de Estados Unidos n°. 6.407.221 de Capon *et al.* Por ejemplo, el documento WO1993/019163 divulga que fusionando un gen de dominio Fv monocatenario (scFv) de un anticuerpo específico, compuesto de V<sub>L</sub> unida a V<sub>H</sub> por una unión flexible, con un segmento génico que codifica un extracelular corto y todos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de una molécula de activación de linfocitos, se obtiene un gen quimérico que combina el sitio de reconocimiento de

anticuerpos y el elemento de señalización de linfocitos en una cadena continua. Tras la transfección de dicho gen de receptor scFv quimérico (c-scFvR) en los linfocitos, se expresa en la célula como un receptor funcional y dota a las células de especificidad de tipo anticuerpo. Los genes quiméricos adecuados para dotar a las células de linfocitos con especificidad de tipo anticuerpo se divulgan en el documento WO1993/019163. Son adecuados diversos tipos de linfocitos, por ejemplo, células asesinas naturales, células T colaboradoras, células T supresoras, células T citotóxicas, células activadas por linfocinas, subtipos de las mismas y cualquier otro tipo de célula que pueda expresar la cadena del receptor quimérico. El gen quimérico comprende un primer segmento génico que codifica el scFv de un anticuerpo específico, es decir, secuencias de ADN que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera ( $V_H$  y  $V_L$ , respectivamente) del anticuerpo específico, unidas por una unión flexible y un segundo segmento génico que comprende una secuencia de ADN que codifica parcial o totalmente los dominios transmembrana y citoplásmico, y opcionalmente los dominios extracelulares de una molécula activadora de linfocitos correspondiente a un receptor de linfocitos o a una parte del mismo. Además, como se trató en la anterior sección "Antecedentes", se conocen métodos para redirigir las células T primarias que albergan un receptor quimérico (TPCR), incluyendo un elemento de señalización adicional (por ejemplo, CD28 o CD137 o su combinación), que es capaz de activar las células T vírgenes de manera independiente de la co-estimulación [8]. Aunque se prefiere el uso de un scFv como dominio extracelular del receptor quimérico, se puede utilizar cualquier ligando específico tumoral para este fin. El scFv específico tumoral, u otro ligando, que es parte del receptor quimérico transducido en las células T se debe seleccionar de manera que se dirija hacia el tipo específico de tumor en el paciente que se está tratando. Por ejemplo, HER2 es un marcador de cáncer de mama. El anticuerpo N29 es un anticuerpo anti-HER2. Por lo tanto, cuando el tumor que se está tratando es cáncer de mama que muestra HER2, en una realización preferida de la presente invención, las células T alogénicas se pueden transducir con un vector para expresar el receptor N29 quimérico después de la activación. Véase de nuevo, la descripción en WO1993/019163 de Eshhar *et al.*

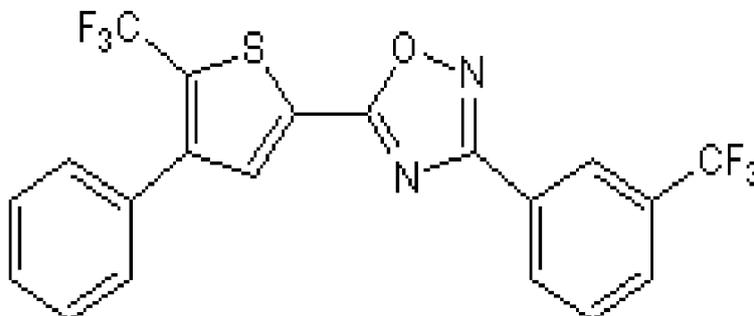
Otra realización de la divulgación implica una terapia combinada que comprende uno o más de los enfoques descritos en el presente documento. Por ejemplo, el método puede implicar la administración de una cantidad efectiva de células T alogénicas con un receptor quimérico de MHC no restringido; y uno o más inhibidores de la salida de linfocitos para retrasar la egrésión de las células T alogénicas de los ganglios linfáticos del paciente después de la transferencia adoptiva de las células T alogénicas al sujeto atrapando las células T en los ganglios linfáticos. Esta realización proporciona la captura de linfocitos del donante en órganos linfáticos para prevenir la GVHD mediante la administración de uno o más inhibidores de la salida de linfocitos, antes de la etapa de administración. Un ejemplo de un inhibidor de la salida de linfocitos es FTY720. FTY720 previene la salida de linfocitos uniéndose al receptor S1P ( $S1P_1$  en linfocitos), que regula la salida de linfocitos de los ganglios linfáticos. Ejemplos de otros compuestos conocidos que logran esto incluyen: SEW2871, W123 y KRP-203-fosfato. Los expertos en la técnica podrían encontrar fácilmente y usar compuestos similares o relacionados que tengan la función deseada de inhibir la salida de linfocitos y se considera que el uso de cualquiera de dichos compuestos es parte de la presente divulgación. De nuevo, el uso de un inhibidor de la salida de linfocitos puede aumentar la respuesta antitumoral y, por lo tanto, puede usarse en combinación con uno o más de los otros enfoques descritos en el presente documento.

FTY720, también conocido como Fingolimod, es un inmunomodulador. Se deriva del metabolito Miriocina (ISP-1) del hongo *Isaria sinclairii*. Es un análogo estructural de la esfingosina y se fosforila por las esfingosinas quininas en la célula (la más importante es la esfingosina quinasa 2). Se cree que la biología molecular del fosfo-fingolimod reside en su actividad en uno de los cinco receptores de esfingosina-1-fosfato,  $S1P_1$ . Puede secuestrar linfocitos en los ganglios linfáticos, evitando que se muevan al sistema nervioso central para las respuestas autoinmunes en la esclerosis múltiple y se propuso originalmente como un medicamento anti-rechazo indicado después del trasplante. El uso de FTY720 como un fármaco inmunosupresor se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 7.605.171 de Colandrea *et al.* El nombre sistemático IUPAC para FTY720 es 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol (MW: 307.470820 g/mol | MF:  $C_{19}H_{33}NO_2$ ) y tiene la fórmula general que se muestra a continuación (para el clorhidrato de Fingolimod).



SEW2871 es otro ejemplo de un inhibidor de la salida de linfocitos. Es un agonista del receptor de esfingosina-1-fosfato 1 ( $S1P_1$ ) potente y selectivo. Activa el receptor  $S1P_1$  con una  $EC_{50}$  de 13 nM, pero no activa los receptores

S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> o S1P<sub>5</sub> en concentraciones de hasta 10 µM. Es permeable a las células y activo *in vivo*. Su nombre químico es 5-[4-Fenil-5-(trifluorometil)tiofen-2-il]-3-[3-(trifluorometil)fenil]1, 2,4-oxadiazol, y tiene la fórmula general que se muestra a continuación.

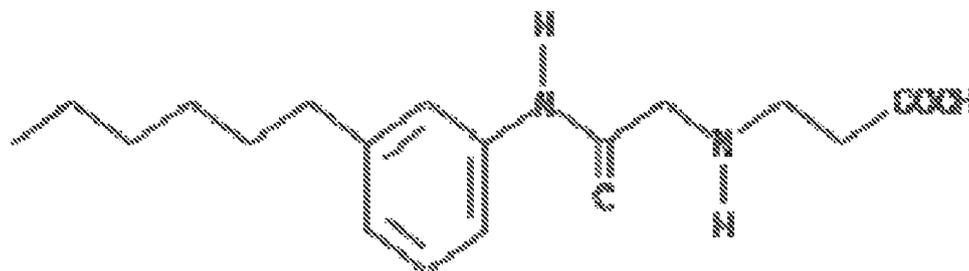


5

Se debe observar que el receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1P<sub>1</sub>) es uno de los cinco receptores S1P acoplados a proteína G de alta afinidad que median una variedad de efectos, incluyendo la recirculación de linfocitos en la sangre. Los agonistas del receptor S1P no selectivos, tales como FTY720, producen inmunosupresión clínica útil para prevenir el rechazo de trasplantes y tratar enfermedades autoinmunes. Sin embargo, también causan bradicardia al activar S1P<sub>3</sub>, el receptor responsable de la regulación de la frecuencia cardíaca. SEW2871 es un agonista selectivo del receptor S1P<sub>1</sub> tanto en humanos como en ratones que no está activo en los receptores S1P<sub>2-5</sub>. SEW2871, por lo tanto, suprime la respuesta inmune al disminuir el número de linfocitos que circulan en la sangre sin causar bradicardia.

10

W123 es otro ejemplo de un inhibidor de la salida de linfocitos. W123 es un análogo de FTY720 que es un antagonista competitivo de S1P<sub>1</sub>. Su nombre químico es ácido 3-(2-(-hexilfenilamino)-2-oxoetilamino) propanoico y tiene la fórmula general que se muestra a continuación.

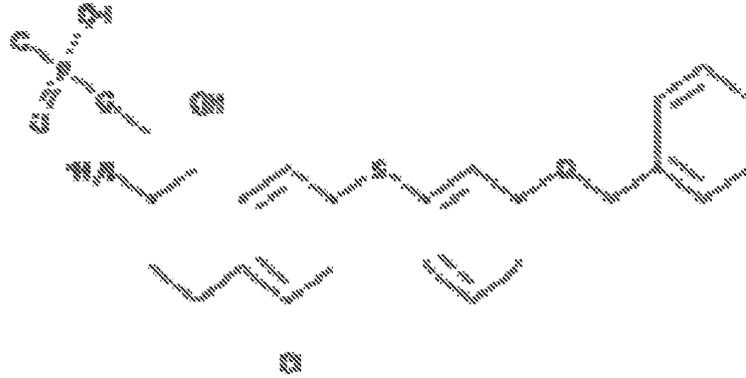


20

El KRP-203-fosfato es otro ejemplo de un inhibidor de la salida de linfocitos. KRP-203 es un agonista del receptor S1P que puede alterar la localización de linfocitos y actuar como un agente inmunomodulador. KRP-203 es un agonista selectivo del receptor S1P<sub>1</sub> que actúa como un inmunosupresor. KRP 203 se fosforila rápidamente *in vivo*, lo que indica que KRP 203 actúa como un profármaco para el agonista S1P<sub>1</sub> real, el KRP 203-fosfato. Al igual que KRP 203, el KRP203-fosfato es un agonista selectivo del receptor S1P<sub>1</sub>, lo que demuestra una alta afinidad por S1P<sub>1</sub> (valor ED<sub>50</sub> en el rango nM) pero no por S1P<sub>3</sub> (ED<sub>50</sub>>1 µM). Por lo tanto, los efectos inmunosupresores de KRP 203 son comparables a FTY720 (un agonista del receptor S1P no selectivo), mientras que la incidencia de bradicardia se reduce 10 veces con el KRP 203-fosfato en comparación con FTY720. Cuando se combina con una dosis baja de ciclosporina A, el KRP 203-fosfato prolonga la supervivencia del aloinjerto y mejora la función del injerto. Su nombre químico es 2-amonio-4-(2-cloro-4-(3-fenoxifenil)fenil)-2-(hidroximetil)butil hidrógeno fosfato y tiene la fórmula general que se muestra a continuación.

25

30



5 En otra realización de una terapia de combinación, el método de la divulgación comprende adicionalmente el enfoque del “silenciamiento” de inhibir el reconocimiento y la eliminación de las células T alogénicas *in vivo* por las células T para reducir de este modo el rechazo de las células alogénicas. En este enfoque, la etapa de inhibición comprende silenciar la expresión de MHC administrando un agente que elimine la expresión de MHC, como el shRNA, o utilizando células alogénicas de seres humanos que albergan mutaciones que afectan la expresión de moléculas de MHC y expresan un ligando inhibitorio de células NK en las células T alogénicas. También se puede usar el antisentido RNA, así como cualquier otra técnica conocida para silenciar la expresión de MHC.

10 En otra realización, el método de tratamiento comprende además someter al paciente a una etapa de precondicionamiento de linfodepleción antes de la etapa de administración. La linfodepleción afecta el sistema inmune del huésped para retrasar el rechazo de las células alogénicas y, por lo tanto, proporcionar tiempo para que actúen las células alogénicas transferidas. El tratamiento de linfodepleción de la presente invención puede ser uno seleccionado del grupo que consiste en tratamiento por radiación, quimioterapia y depleción por anticuerpos.

En una realización, el tratamiento de linfodepleción es el tratamiento por radiación.

20 En otra realización, el tratamiento de linfodepleción comprende quimioterapia que usa un agente depletante de linfocitos, tal como ciclofosfamida. La ciclofosfamida es solo una de las formas de quimioterapia que pueden usarse para precondicionar (linfodeplecionar) al huésped. Otras alternativas son fludarabina, busulfán, melfalán o depleción por anticuerpos, tal como Mabthera.

25 Como se describe en el presente documento, un objetivo de la etapa de linfodepleción, en combinación con la dosificación seleccionada de células quiméricas alogénicas, es suprimir el sistema inmune durante un tiempo suficiente para permitir que se manifieste la actividad antitumoral de las células T quiméricas alogénicas dirigidas al tumor. Es importante que el sistema inmune nativo se regenere en un período de tiempo razonable para atacar a las células T alogénicas y eliminarlas del sistema una vez que hayan cumplido su objetivo inicial. Preferiblemente, la etapa de linfodepleción reducirá la cantidad de células T en el huésped en la misma cantidad, o aproximadamente la misma cantidad, que se agregará en la terapia de transferencia de células adoptivas. Por consiguiente, en una realización preferida, la cantidad de células T quiméricas alogénicas administradas es suficiente para devolver la población de linfocitos linfodeplecionados a su cantidad homeostática, es decir, la cantidad normal para ese paciente cuando está sano. Por lo tanto, la linfodepleción con los procedimientos de transferencia de células adoptivas mantendrá preferiblemente un equilibrio de células en el huésped para minimizar tanto la GvHD como la HvGD, permitiendo al mismo tiempo la actividad antitumoral de GvH.

30 La dosis máxima de radiación o quimioterapia para la linfodepleción debe ser menor que la cantidad que requeriría el rescate del sistema inmune del huésped mediante trasplante de médula ósea (TMO). Por ejemplo, en el modelo de ratón, los ratones pueden soportar menos de 500 rads de tratamiento de radiación sin la necesidad de TMO. A 500 rads o más, se necesitará TMO. Para agentes quimioterapéuticos, las dosis mínimas para el uso con TMO son conocidas en el campo. Las dosis aceptables se pueden extrapolar a partir de lo que se conoce. Para ensayos clínicos, la persona experta podría determinar empíricamente las cantidades óptimas para prevenir la GvHD y también evitar la necesidad de TMO. Como es sabido por cualquiera que diseñe ensayos clínicos para determinar las dosis óptimas para linfodepleción y para la administración de ACT, se usarán regímenes de dosificación progresiva mientras se monitoriza cuidadosamente la respuesta inmune, como por ejemplo mediante la reacción linfocitaria mixta o monitorizando la liberación de citoquinas en la sangre. Si se observa que las células alogénicas atacan a las células normales en el paciente, entonces la linfodepleción y/o la dosis de células era demasiado alta. Si las células alogénicas son eliminadas antes de atacar los tumores a los que están dirigidas, la linfodepleción y/o la dosis de células era demasiado baja.

5 Las células T alogénicas son células T alogénicas específicas tumorales. Las células T alogénicas se pueden activar y expandir antes de la etapa de administración. Las células T se activan *in vitro* con concanavalina A (conA) o anticuerpos CD3/CD28 durante 48 horas, y luego se expanden con una citoquina como IL-2, IL-7, IL-15 y / o IL-21 hasta durante 5 días. Las células tumorales también pueden usarse como un activador.

10 En el método de la presente invención, el número de células T alogénicas administradas al sujeto es superior a 30 millones. El número de células oscila entre 5 y 100 millones. La cantidad de células puede elegirse entre 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células. En la presente divulgación, el término "una célula" o "células" tal como se usa en el presente documento se refiere tanto a células singulares como a poblaciones de células.

Las células T alogénicas se pueden administrar en una o más dosis y durante un período de tiempo.

15 Las células T de la presente divulgación se pueden obtener a partir de cualquier fuente, tal como un banco de sangre o un donante (por ejemplo, un descendiente, hermano o progenitor del paciente), siempre que sean alogénicas. Por alogénico, se entiende que las células o tejidos son genéticamente diferentes porque derivan de individuos separados de la misma especie.

20 Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de rangos óptimos de cantidades efectivas de un tipo de célula dado para una enfermedad o condición particular está dentro del estado de la técnica. La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si existe, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. La determinación de las cantidades efectivas, para un grado dado de linfodepleción, puede hacerse fácilmente de forma empírica por los expertos normales en la técnica sin una experimentación excesiva, tal como se trató anteriormente.

25 Las composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, de la presente divulgación se pueden administrar mediante cualquiera de los diversos medios y vías conocidos en la técnica. Las vías preferidas incluyen parenteral, intravenosa, intratumoral, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraarticular, intracerebroventricular o intraluminal. También se incluye la vía "intratecal", que pretende abarcar la inyección, implantación o instilación directamente en una cavidad o espacio que rodea un órgano o región corporal en la que se produzca una respuesta inmune/inflamatoria no deseada. Tales espacios incluyen el espacio pleural, el peritoneo, el espacio subaracnoideo o espacio dural o el espacio pericárdico. El término genérico para la administración en una envoltura que recubre un órgano se denomina "intratecal" (véase, por ejemplo, la definición en el Diccionario Médico de Dorland 29ª Edición, WB Saunders (2000) y Diccionario Médico de Stedman, 27ª Edición, Lippincott, Williams & Wilkins (2000)), que significa "dentro de una envoltura". Tal y como se usa en el presente documento, este término pretende ser más amplio que en la definición más comúnmente utilizada que se limita a los espacios intracraneales.

40 Las composiciones, métodos y productos de la presente divulgación son aplicables a usos humanos y veterinarios. Los sujetos animales preferidos a tratar son mamíferos, y preferiblemente, humanos.

45 La presente divulgación proporciona además una composición terapéutica, tal como una composición farmacéutica, que comprende las células T alogénicas y, opcionalmente, uno o más de los otros agentes activos descritos en el presente documento, junto con cualquier excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal y como se usa en el presente documento, un vehículo terapéuticamente aceptable incluye cualquiera y todos los disolventes, incluyendo agua, medios de dispersión, cultivo de medios celulares, agentes isotónicos y similares que no sean tóxicos para el huésped. Preferiblemente, es una solución acuosa tamponada isotónica con un pH de alrededor de 7,0. El uso de tales medios y agentes en composiciones terapéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las células T alogénicas de la presente divulgación, se contempla el uso de dicho medio o agente convencional en las composiciones terapéuticas. Ingredientes activos suplementarios también pueden ser incorporados en las composiciones.

50 La presente invención puede usarse opcionalmente en combinación con otros tratamientos y terapias contra el cáncer conocidos, y el presente documento se refiere a todos los agentes farmacológicos y/o fármacos que tratan el cáncer, y preferiblemente como terapia adyuvante para evitar el desarrollo metastásico, tal como la enfermedad metastásica mínima, EMR.

## DISCUSIÓN Y RESULTADOS

60 El objetivo de la presente divulgación era desarrollar una terapia adoptiva alogénica segura y eficaz para el tratamiento del cáncer.

Con anterioridad a la divulgación, las terapias adoptivas usaban células singénicas casi exclusivamente, lo que significa que cada tratamiento tenía que fabricarse específicamente para cada paciente a un coste y gasto

considerables. Los cuerpos T pueden atacar a los tumores de manera independiente del MHC [8] y, por lo tanto, cuerpos T alogénicos completamente incompatibles podrían usarse como “células efectoras universales”, capaces de habilitar ACT independientemente del MHC del paciente. El uso de cuerpos T alogénicos podría constituir un salto cuantitativo en términos económicos de ACT, convirtiéndolo en terapia estandarizada. Una ventaja no apreciada en el uso de ACT alogénica podría ser la promoción de una mejor comprensión de la inmunoterapia tumoral al permitir comparaciones directas entre pacientes tratados con las mismas células, en contraste con la situación actual donde cada paciente se trata con un lote diferente de células.

El primer enfoque usado para habilitar la ACT alogénica fue mediante la prevención de la reacción HvG por “silenciamiento” de las células transferidas. El ShRNA demostró ser prometedor para silenciar la expresión de MHC I (**Figura 1-2**), pero la expresión de los ligandos inhibidores no logró inhibir suficientemente la citotoxicidad de NK (**Figura 5**), lo que llevó a los inventores a buscar un segundo enfoque.

En el segundo enfoque, los inventores plantearon la hipótesis de que la linfodepleción parcial podría crear una ventana de tiempo terapéutico en la que los cuerpos T pudieran atacar y destruir el tumor, pero sin ser rechazados, evitando así la GvHD. Usando esta estrategia, los inventores trataron de demostrar que se pueden administrar de manera segura un gran número de células T redirigidas de repertorio abierto, sin mortalidad asociada a GvHD y con muy poco daño, según lo evaluado por histología. Los resultados de la presente divulgación muestran que los cuerpos T alogénicos pueden mediar un beneficio terapéutico significativo en un modelo clínicamente relevante de enfermedad residual mínima del modelo de tumor sólido HER2<sup>+</sup> triplicando el tiempo medio de supervivencia en comparación con el grupo no tratado con 30-40 % de supervivientes a largo plazo (**Figura 11**). La transferencia adoptiva de un gran número de cuerpos T alogénicos a ratones precondicionados produjo un beneficio equivalente a los cuerpos T singénicos, y fue muy superior a las células alogénicas de tipo salvaje, demostrando que la respuesta era específica tumoral (**Figura 10**). El tratamiento incluyó un precondicionamiento relativamente leve y ningún TMO, dejando el sistema inmune del huésped relativamente intacto. Las células transferidas no se injertaron, y persistieron *in vivo* solo transitoriamente (**Figuras 16, 19 y 20**), evitando los riesgos potenciales resultantes de la mutagénesis insercional por retrovectores modificados genéticamente [44-46]. Cuando se inyectaron *i.v.*, se pudieron detectar células alogénicas del donante en el pulmón, el hígado, el bazo, la médula ósea y los ganglios linfáticos que constituyen los sitios más comunes de metástasis del cáncer (**Figura 17A**). El análisis histológico confirmó este patrón de migración y mostró infiltración celular de pulmón, hígado e intestino (**Figura 14**). El tratamiento temporal con FTY720 inhibió simultáneamente la GvHD y potenció la respuesta antitumoral. En estas condiciones, el 50-80 % de los ratones portadores de tumores sobrevivieron a largo plazo (**Figura 18**), lo que demuestra que las células alogénicas pueden proporcionar un beneficio superior en comparación con las células singénicas. Los datos de formación de imágenes *in vivo* usando cuerpos T que expresan luciferasa demuestran que la prevención de la egrésión de linfocitos mediante la administración de FTY720 prolonga la supervivencia *in vivo* de los cuerpos T alogénicos (**Figura 20**).

La aplicación de ACT alogénica es un gran desafío, debido a la doble problemática de la HvG que limita la persistencia de las células alogénicas, por un lado, y de la GvH que puede ocurrir si no se controlan las células alogénicas, por otro lado. Hasta ahora, prácticamente todos los intentos de ACT alogénica se han realizado en el marco del TMO alogénico (alo-TMO). Dado que se trasplanta al huésped el sistema hematopoyético del donante, no rechaza nunca más células de origen donante, en otras palabras, la reacción HvG se elimina por completo. En lugar de que el huésped rechace las células, las células transferidas atacan al huésped, causando GvHD severa en muchos pacientes (incluso en casos de compatibilidad completa con MHC). Es importante destacar que, si bien esta estrategia puede ser eficaz contra la enfermedad hematológica (en particular, LMC), tiene sus inconvenientes, a saber, la necesidad de una compatibilidad completa o casi completa del MHC entre el donante y el huésped. Además, incluso cuando se encuentra un donante adecuado para alo-TMO, solo la célula de ese donante puede transferirse con éxito después del TMO, lo que significa que esta estrategia no puede emplearse como una terapia estandarizada.

Dado que uno de los objetos de la presente divulgación era desarrollar ACT alogénica estandarizada, se necesitaba una estrategia alternativa a la alo-TMO. Se descubrió que se puede crear una ventana de tiempo terapéutico usando linfodepleción, lo que daría a las células del donante tiempo suficiente para atacar el tumor antes de ser rechazadas. La creación de dicha ventana de tiempo requeriría una valoración cuidadosa no solo del precondicionamiento del huésped, sino también del número de células transferidas. Como se esperaba, se descubrió que el riesgo de GvHD está en función tanto de la dosis de radiación como de la dosis celular (**Figura 6**). Curiosamente, se descubrió que la GvHD letal no podía inducirse cuando se usaban dosis bajas de radiación (200 rads), incluso cuando se transferían hasta  $10^8$  células T activadas (**Figura 6B**). Por el contrario, tan solo  $50 \times 10^6$  células T activadas (C57B1 de tipo salvaje, no C57B1 - N29) podrían causar GvHD letal después de la radiación con 400 rads (**Figura 6C**). Se lograron resultados terapéuticos impresionantes en el modelo tumoral usando cualquiera de los dos regímenes (400/30 o 200/100), demostrando que una dosis alta de células puede compensar al menos parcialmente una baja dosis de radiación y viceversa. Finalmente, se demostró que la linfodepleción antes de la ACT alogénica se podía lograr usando la quimioterapia (ciclofosfamida en este caso) y no solo la radiación. La transferencia de  $10^8$  células T activadas tras el precondicionamiento con 200 mg/kg de ciclofosfamida provocó una GvHD letal del 100 % (datos

no mostrados), demostrando que la ciclofosfamida (a 200 mg/kg) depleciona los linfocitos más eficazmente que la radiación de 200 rads. Como era de esperar, el aumento del precondicionamiento (200 mg/kg de ciclofosfamida frente a 200 rads) permitió el uso de una dosis celular más pequeña ( $20 \times 10^6$  frente a  $10^8$ ), al tiempo que se mantenía un beneficio equivalente entre los cuerpos T alogénicos y singénicos (**Figura 13**), demostrando de forma concluyente que podrían usarse dosis celulares más bajas junto con un mayor precondicionamiento sin comprometer la eficacia antitumoral y sin causar GvHD.

Una suposición implícita de la estrategia de la ventana de tiempo terapéutico es que la ACT exitosa puede lograrse incluso con una persistencia limitada de las células transferidas. Se llegó a la conclusión de que la eficacia de la respuesta antitumoral es proporcional no solo a la duración de la respuesta inmune sino también a su magnitud, por lo que una respuesta breve pero poderosa puede ser tan eficaz como una respuesta más débil con una duración más larga. Esta suposición pone en tela de juicio la opinión que prevalece actualmente en el campo de la inmunoterapia de que la reducción de la persistencia es una de las principales limitaciones que enfrenta la inmunoterapia en la actualidad, y que el aumento de la persistencia mejorará la eficacia de los enfoques inmunoterapéuticos. Esta visión está respaldada por datos de ensayos clínicos que muestran una correlación entre la persistencia de las células transferidas y el beneficio terapéutico [47, 48]. Klebanof *et al.* demostraron que la transferencia de células T de memoria central proporciona un beneficio terapéutico superior en un modelo de melanoma murino, y persisten *in vivo* durante más tiempo en comparación con las células T con un fenotipo de memoria efectora [20]. El beneficio terapéutico superior proporcionado por las células T de memoria central dependía de la localización en los ganglios linfáticos, donde las células T proliferaban ampliamente en respuesta a la vacunación y altas dosis de IL-2 [20]. Es posible que la correlación entre la persistencia y el beneficio terapéutico simplemente refleje el hecho de que la funcionalidad mejorada (por parte de las células T de memoria central) también puede conducir a una mayor persistencia, pero esa persistencia a largo plazo en sí misma no es un requisito para el éxito de la ACT. De hecho, se lograron resultados terapéuticos impresionantes (**Figuras 11 y 12**) a pesar de que las células fueron eventualmente rechazadas (**Figuras 16, 19 y 20**). Presumiblemente, el uso de un gran número de células ( $10^8$ ) compensó la limitada persistencia. El mayor precondicionamiento puede retrasar el rechazo de las células transferidas, aumentando así su persistencia. Sin embargo, el aumento de la persistencia también aumenta el riesgo de GvHD (**Figura 6**) y, por lo tanto, el aumento del precondicionamiento se produce a expensas de la dosis celular. Cuando se comparó el régimen de precondicionamiento más bajo/ dosis celular más alta (200/100) y el régimen de precondicionamiento más alto/dosis celular más baja (400/30), el aumento de la dosis celular fue más efectivo que el aumento de la dosis de radiación en el presente modelo tumoral (**Figura 11C**), demostrando que en algunos modelos tumorales, el aumento de la persistencia no es necesariamente la mejor opción cuando se considera tanto la eficacia antitumoral como el riesgo de GvHD.

Encontrar el equilibrio entre la eficacia antitumoral y la prevención de la GvHD también puede afectar otros aspectos de la ACT alogénica. A saber, el fenotipo de las células T transferidas puede tener un profundo impacto en el resultado de la terapia. En la configuración singénica, se ha demostrado que la eficacia superior de las células T (Tcm) de memoria central sobre las células T (Tem) de memoria efectora en un modelo de melanoma murino se deriva de la capacidad de las células Tcm de transitar a los ganglios linfáticos y luego proliferar masivamente en respuesta a la vacunación [20]. Esta funcionalidad mejorada de Tcm también se ha demostrado en la configuración del alo-TMO [23]. Las Tcm causan GvHD más graves que los Tem, y de nuevo esta funcionalidad mejorada dependía del tránsito a los ganglios linfáticos seguido de una proliferación masiva [18]. Por lo tanto, las Tcm son efectores más potentes tanto en la respuesta antitumoral como en la respuesta GvH, y por lo tanto no son necesariamente la opción óptima para su uso en ACT alogénica [23]. Un ejemplo interesante de una terapia que evita el uso de células Tcm en ACT alogénica se ha desarrollado en el laboratorio de Robert Negrin, y en su lugar utiliza células asesinas inducidas por citoquinas (CIK) [27]. Las células CIK se generan a través del cultivo de células T en presencia de IFN- $\gamma$ , y son capaces de matar una amplia gama de tumores *in vitro* de manera dependiente de NKG2D [27, 29]. Una de las características interesantes de estas células es que cuando las células CIK derivadas de donantes se transfieren después de la alo-TMO, causan mucho menos GvHD en comparación con esplenocitos frescos del donante [27]. Las investigaciones sobre el mecanismo que está detrás de esta capacidad reducida para GvHD han demostrado que estas células tienen el fenotipo de células T terminalmente diferenciadas, y tienen una capacidad de proliferación muy reducida después de la transferencia adoptiva [28]. Las células CIK han mostrado cierta eficacia en modelos murinos de linfoma residual mínimo, demostrando que la eficacia antitumoral puede al menos mantenerse parcialmente a pesar de la ausencia de GvHD [27, 28]. Este enfoque demuestra la utilidad de usar células T diferenciadas terminalmente en la configuración alogénica a pesar de su limitación funcional (en particular, la capacidad reducida para la proliferación). Si bien este enfoque proporcionó un beneficio terapéutico, cabe destacar que la carga tumoral en su modelo es relativamente baja (inyección de células tumorales y CIK un día después del alo-TMO), y que los tumores hematopoyéticos, que utilizaron en su modelo, son particularmente susceptibles al ataque alogénico. Los modelos tumorales más desafiantes con cargas tumorales más altas requieren el uso de Tcm, y por lo tanto requerirían encontrar una solución satisfactoria al problema de GvHD.

Antes de la presente divulgación, se han realizado varios estudios en los últimos años que han utilizado la terapia adoptiva alogénica para tratar el cáncer. La mayoría de estos intentos implicó la transferencia de varios tipos de células del donante (por ejemplo, células CIK) después de la alo-TMO, y este tipo de tratamiento debe ser

específicamente fabricado para cada paciente. Sin embargo, se publicaron dos estudios dignos de mención que no emplearon alo-TMO. En un estudio, Boni *et al.* demostraron que la transferencia adoptiva de esplenocitos TCR transgénicos alogénicos en ratones radiados con 9 Gray junto con TMO autólogo puede tratar los melanomas B16 establecidos [30]. Aunque los resultados terapéuticos son impresionantes, esta estrategia no se puede utilizar como un tratamiento estandarizado y todavía hay dudas de que esta terapia se pueda adaptar clínicamente. A diferencia de la investigación descrita en la presente divulgación, Boni *et al.* usan esplenocitos transgénicos haploidénticos como células donantes [30]. Si bien es un desafío, no se trata de un modelo completamente desparejado y, por lo tanto, la compatibilidad donante-huésped aún sería necesaria, anulando la posibilidad de utilizar esta estrategia como una terapia estandarizada. La aplicación clínica de este estudio es un desafío porque el éxito de esta terapia depende del uso de esplenocitos TCR transgénicos. Los investigadores demuestran que la falta de GvHD en este modelo se deriva de la alorreactividad limitada debido a la expresión de un solo TCR por todas las células T [30]. La traslación de esta terapia a la clínica requeriría la generación de células T específicas tumorales a partir de células T policlonales. Hay dos formas principales de generar tales células: expansión de células T específicas de antígeno o redirección a través de transducción con un TCR o un receptor quimérico (como se hace en la presente divulgación). Sin embargo, aunque la transducción puede usarse para redirigir las células T, el TCR endógeno conserva su funcionalidad, creando esencialmente células T específicas tumorales de repertorio abierto que causarían GvHD grave, como los investigadores mostraron en su artículo [30]. La opción alternativa de expandir las células T específicas de antígeno se enfrenta a dos obstáculos. El primer obstáculo es que, si bien el repertorio de TCR de CTL es limitado, de ninguna manera es monoclonal. Por lo tanto, aunque tales líneas de CTL definitivamente causarían menos GvHD que las células T de repertorio abierto, sin embargo, causarían más GvHD que las células T monoclonales utilizadas en el estudio. El segundo obstáculo es que la expansión de las células T requiere un tiempo de propagación prolongado que causa una diferenciación progresiva de las células T y, subsecuentemente, una pérdida gradual de la capacidad proliferativa (como lo muestra el mismo grupo [49]). En el estudio, los investigadores transfirieron esplenocitos TCR transgénicos vírgenes, mientras que en la práctica clínica tendrían que emplear células T que fueran previamente activadas y al menos parcialmente diferenciadas. Esto significa que el beneficio terapéutico observado en este estudio probablemente sea una sobreestimación del beneficio que podría lograrse en la clínica. Es precisamente a causa de estos problemas que, en la presente divulgación, las células T se activaron y expandieron antes de la transferencia adoptiva, de modo que los experimentos simularían más fielmente la práctica clínica.

En otra publicación reciente anterior a la presente divulgación, Zakrzewski *et al.* transfieren de forma adoptiva precursores de células T alogénicas modificadas con CAR (receptor de antígenos quiméricos) después de TMO singénico para tratar una enfermedad residual mínima de un modelo murino de linfoma [31]. La maduración de los precursores de células T alogénicas en el huésped purga su reactividad GvH, evitando por completo la GvHD [31]. Desafortunadamente, la purga de la reactividad de GvH también purga la actividad de GvL, como lo demuestra la falta de eficacia de precursores de células T alogénicas no modificadas contra el linfoma murino que expresa CD19 [31]. La reactividad tumoral se obtiene mediante la transducción de los precursores de células T con un receptor quimérico antitumoral (anti-CD19 en este estudio) [31]. Este estudio previo presenta una estrategia de vanguardia para tratar el tumor maligno post-TMO, y su combinación con la ingeniería genética proporciona una forma general de atacar cualquier tumor, siempre que se conozca un antígeno diana. Sin embargo, la eficacia proporcionada por las células modificadas con CAR fue muy modesta, aumentando la supervivencia media de 20 a alrededor de 30 días, sin supervivientes a largo plazo [31]. De forma similar a la presente divulgación, los investigadores también intentaron tratar la enfermedad metastásica utilizando la línea celular de Renca transducida con GFP, luciferasa y timidina quinasa (Renca-TGL) [31]. Por lo tanto, es interesante comparar los datos de este estudio con los datos de la presente divulgación. Dado que el tratamiento de Renca-TGL se realizó de una manera no específica (sin redirección del receptor quimérico), se deben comparar sus resultados con los resultados obtenidos en la presente divulgación con células alogénicas no modificadas. En la presente divulgación, los inventores trataron el día 7 las metástasis pulmonares de Renca-erbB2 establecidas, mientras que Zakrzewski *et al.* trataron la enfermedad de Renca-TGL no establecida (el tumor y la transferencia adoptiva se inyectaron el mismo día). Zakrzewski *et al.* lograron extender la supervivencia media en 5 días, mientras que el método de la presente divulgación logró extender la supervivencia media en 20 días, y en ambos casos no hubo supervivientes a largo plazo [31]. Aunque que los presentes inventores trataron las metástasis establecidas, mientras que Zakrzewski *et al.* trataron células tumorales circulantes (un modelo clínicamente irrelevante), los presentes inventores aún lograron proporcionar un beneficio terapéutico significativamente mayor, y se debe concluir que el tratamiento de la presente divulgación fue al menos un orden de magnitud (y probablemente más) más potente que el enfoque de aquellos. Esto probablemente se deba al número de células T maduras y a su velocidad de maduración a partir del timo [31]. A los 14 días después del TMO, hay menos de  $10^6$  células T derivadas del donante (y, por lo tanto, que expresan CAR) en el bazo, que se expanden a  $3-4 \times 10^6$  células T para el día 28 [31]. El número de células T específicas tumorales generadas *in vivo* es relativamente bajo en comparación con la mayoría de los protocolos comunes para ACT. Además, la respuesta antitumoral tarda algún tiempo (menos de  $10^6$  células T en el día 14) en desarrollarse, y esta demora puede permitir que el tumor crezca sin impedimentos, lo que podría explicar el beneficio relativamente débil proporcionado por este tratamiento.

Una característica que todos los intentos de ACT alogénica comparten es el uso de TMO autólogo o alogénico. El TMO alogénico es, por supuesto, mucho más peligroso debido al riesgo de GvHD, pero el TMO autólogo no está exento de problemas. La reconstitución mieloide y linfóide lleva tiempo, y en ese tiempo pueden surgir complicaciones que amenazan la vida. Las complicaciones más notorias son las infecciones oportunistas, así como la reactivación de infecciones virales latentes como CMV o EBV, todas las cuales pueden tener consecuencias letales [13]. Debido a los inconvenientes de este tratamiento, rara vez se ofrece como terapia de primera línea, sino que se reserva para pacientes que han fracasado en otros tratamientos o que han presentado una recaída. Además, muchos pacientes (por lo general, pacientes de edad avanzada) no son aptos para TMO debido a la mala condición física. Además de todas estas preocupaciones, el precio económico del TMO es muy alto debido al prolongado tiempo de hospitalización que necesitan los pacientes. Por todas estas razones, el tratamiento de la presente divulgación, que no incluye TMO, tiene una clara ventaja sobre las alternativas, en particular como un tratamiento de primera línea en el tratamiento de la enfermedad en etapa temprana, así como una terapia adyuvante para la enfermedad residual mínima.

Los resultados presentados en el presente documento son muy prometedores y representan una prueba del concepto de terapia celular adoptiva alogénica segura y efectiva. Un punto importante demostrado por el trabajo de la presente divulgación es que cuando se aplica ACT alogénica, debe mantenerse un equilibrio entre el grado de precondicionamiento y el número de células transferidas. Los inventores demostraron que el uso de más precondicionamiento y dosis celulares más bajas puede proporcionar un beneficio terapéutico significativo, y puede ser tan eficaz como la ACT singénica. Sin embargo, incluso la alta dosis de células que los inventores usaron en uno de los protocolos ( $10^8$ ) es realista y puede utilizarse en la clínica.  $10^8$  células son aproximadamente equivalentes al número de células en el bazo de un ratón adulto. El número de linfocitos en el bazo humano se ha estimado en aproximadamente  $10^{10}$ , mientras que el número total de linfocitos en el cuerpo se ha estimado en aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  [50, 51]. Si bien estos números pueden parecer prohibitivos, varios ensayos clínicos en el campo de la terapia adoptiva realmente usan dosis de células en este orden de magnitud, lo que demuestra la viabilidad del enfoque. Porter *et al.* infundieron hasta  $10^{10}$  linfocitos alogénicos estimulados *ex vivo* con aCD3/CD28 en un ensayo clínico de fase I para el tratamiento de tumores malignos hematológicos [52]. En otro ensayo, Rapoport *et al.* (también el laboratorio de Carl June) infundieron hasta  $10^{10}$  aCD3/CD28 autólogo estimulado para el tratamiento de pacientes con LMC en remisión [53]. Dudley *et al.* (el laboratorio de Steve Rosenberg) infundieron hasta  $10^{11}$  linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) en múltiples ensayos clínicos [7]. Estos estudios demuestran que la generación de  $10^{10}$ - $10^{11}$  células T a partir de células mononucleares de sangre periférica es realista, lo que respalda la viabilidad de altas dosis de células en ACT.

En un estudio muy reciente, Gattiononi *et al.* fueron pioneros en un novedoso método de cultivo que mediante la adición del bloqueador de señalización WNT TWS119 permite la expansión de las células T al mismo tiempo que bloquea su diferenciación, produciendo células T con el fenotipo de células madre de memoria o Tscm [54]. Estas células tienen un fenotipo CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup>Sca1<sup>high</sup>CD122<sup>high</sup>Bcl-2<sup>high</sup> que es un fenotipo aún menos diferenciado que las células T de memoria central [54]. En una comparación directa entre las células T de memoria central y las células T de células madre de memoria, Tscm fueron significativamente más eficaces en el tratamiento de los melanomas establecidos [54]. Esta técnica y enfoques similares probablemente permitirán la generación de un gran número de células T relativamente indiferenciadas en el futuro, facilitando la producción de células a gran escala para la terapia adoptiva.

El éxito de la presente invención como terapia en humanos se basa en encontrar el régimen de transferencia adoptiva más potente sin causar GvHD significativa. En ratones, esto se logró mediante la calibración de la dosis de radiación y la dosis celular, y monitorizando la supervivencia de los ratones. Como esta estrategia no se puede usar en humanos, se debe encontrar una alternativa. Una forma de eludir este problema es confiar en los datos clínicos de ensayos previos en pacientes. Un área en la que abunda información disponible son los ensayos clínicos que emplean infusiones de leucocitos de donantes. Estos ensayos han trazado extensamente qué dosis de células alogénicas se pueden administrar de forma segura a pacientes previamente trasplantados con médula ósea alogénica. Es importante destacar que los pacientes con trasplante alogénico de MO ya son parcial o totalmente quiméricos para las células alogénicas, lo que significa que estos pacientes no rechazarán DLI. En ausencia de reactividad HvG, estos pacientes son mucho más susceptibles a GvHD que los pacientes no trasplantados, por lo que los protocolos desarrollados para DLI constituyen un punto de partida excelente y seguro para la terapia adoptiva alogénica. A partir de este punto inicial, la dosis de células puede aumentarse, mientras que se monitoriza a los pacientes para detectar signos tempranos de GvHD, como la pérdida de peso o la elevación de las enzimas hepáticas. Incluso si se desarrolla GvHD, debería ser mucho más susceptible a la intervención terapéutica que los casos habituales de GvHD que se desarrollan después de alo-TMO.

Como se demuestra mediante la presente divulgación, el precondicionamiento de bajo nivel conduce a una persistencia *in vivo* limitada (Figuras 16, 19 y 20) porque la respuesta de HvG no se ablaiona (como es el caso del post alo-TMO) sino que simplemente se retrasa garantizando el eventual rechazo de las células y finalmente suprimiendo la respuesta de GvH. Cuando los presentes inventores usaron el régimen de 200/100 con células T alogénicas no modificadas, el ratón tratado experimentó una pérdida de peso transitoria (**Figura 6D**) derivada de la

reacción de GvH de las células transferidas. La comparación de la cinética de pérdida de peso con los datos de formación de imágenes *in vivo* (**Figura 16**) muestra que el pico de la pérdida de peso correspondió al pico de la señal bioluminiscente de las células transferidas y que después de su rechazo, el ratón recuperó el peso perdido. Como precaución adicional, las células alogénicas pueden transducirse con genes suicidas que podrían activarse si se desarrolla la GvHD [55]. Se ha demostrado que la estrategia de genes suicidas trata eficazmente la GvHD causada por los linfocitos T humanos de memoria central [55].

El mayor desafío asociado con la terapia adoptiva alogénica es el riesgo de GvHD. Inicialmente, los inventores evitaron la GvHD mediante la ponderación cuidadosa de la radiación y las dosis celulares; sin embargo, la GvHD puede reducirse aún más mediante manipulaciones adicionales. Una alternativa es purgar la alorreactividad de las células del donante confiando en un CTL anti-terceros transducido, un método iniciado por el Profesor Yair Reisner [56, 57], y luego transducir estos CTL con receptores quiméricos. Los CTL estimulados por células T de terceros demuestran una reactividad anti-donante atenuada, y podrían servir potencialmente como células del donante en terapia adoptiva con un riesgo reducido de GvHD [56, 57]. La limitación de este método viene dada porque se trata de un procedimiento específico para el paciente, ya que cada paciente requeriría un estimulador de terceros diferente y, por lo tanto, este método no podría utilizarse como terapia estandarizada. Un enfoque alternativo fue el uso de células T de donantes con un repertorio restringido de TCR que tienen muy poco potencial de GvH como lo demuestran los esplenocitos transgénicos pmel utilizados en el estudio de Boni *et al.* [30]. El problema es que tales células T todavía estarían restringidas por MHC, y por lo tanto no podrían usarse como células "efectoras universales". Sin embargo, la creación de un banco de líneas alogénicas de CTL restringidas por las moléculas de MHC más comunes podría proporcionar una solución a la gran mayoría de los pacientes. Se plantea la cuestión de cuál debería ser el antígeno objetivo para la línea CTL. Una posibilidad es apuntar a otro antígeno tumoral, confiriendo así a los cuerpos T CTL una doble especificidad tumoral a través tanto del TCR como de los receptores quiméricos. El principal problema con el uso de líneas CTL es que el cultivo prolongado de células *in vitro* reduce su funcionalidad *in vivo* [49, 58]. Varios estudios han demostrado que la adquisición de la función efectora completa, y específicamente un fenotipo de memoria efectora, deteriora la eficacia antitumoral *in vivo* [20, 49]. Curiosamente, el fenotipo de memoria efectora también se asocia con un riesgo muy reducido de GvHD debido a la migración debilitada a los órganos linfáticos secundarios ya que las células de memoria efectoras no expresan CD62L [18, 59]. Las células T de memoria efectoras median una respuesta restringida independientemente de si el objetivo es un tumor o el huésped. Esta respuesta restringida se asocia, entre otras cosas, con la persistencia reducida de las células transferidas [47, 48, 54]. En un intento de aumentar la persistencia de las células T de memoria efectoras transferidas adoptivamente, Pule *et al.* transdujeron líneas específicas de linfocitos CTL de EBV autólogo con un receptor quimérico específico de GD2, las infundieron en pacientes con neuroblastoma y compararon su persistencia con la de las células T activadas policlonales también transducidas con el receptor quimérico [12]. Los investigadores demostraron que CTL-GD2 específico de EBV persiste durante mucho más tiempo *in vivo* que las células T activadas policlonales, presumiblemente debido a la estimulación *in vivo* por células infectadas por EBV [12]. Esta estrategia podría implementarse mediante el establecimiento de un puñado de líneas alogénicas, cada una restringida a una de las moléculas del MHC más comunes, proporcionando así cobertura al mayor número posible de pacientes. La eficacia de esta estrategia podría teóricamente aumentarse mediante la infección intencional con virus atenuados que estimularían las líneas de una manera mucho más potente que una infección latente. Llevar este enfoque un paso más allá sería combinar las líneas de virus del cuerpo T CTL con virus oncolíticos que podrían dañar el tumor y estimular los cuerpos T *in situ* al mismo tiempo.

Un rasgo común que conecta todos los enfoques para tratar la GvHD es su intento de frenar o prevenir la GvHD. Un enfoque alternativo sería aprovechar la respuesta de la GvHD y redirigirla de manera que beneficie a la respuesta antitumoral. Aprovechar el increíble poder de la GvHD tiene el potencial de aumentar enormemente la eficacia de una respuesta antitumoral alogénica. Con el fin de aprovechar el poder de la respuesta de la GvH, es importante comprender la dinámica de esta reacción. Las células T alorreactivas pueden atacar los tejidos periféricos directamente, pero el verdadero poder de la respuesta proviene de las células T alogénicas que migran a los órganos linfáticos secundarios. Estas células se encuentran con células dendríticas alogénicas que activan y causan la proliferación masiva de células alogénicas que alimentan la respuesta de GvH [14]. Varios estudios han demostrado que la estimulación *in vivo* a través de la vacunación también puede aumentar significativamente una respuesta antitumoral en la configuración singénica [14]. En el caso de una respuesta del cuerpo T antitumoral alogénico, las células de los cuerpos T específicos tumorales reciben estimulación de las células dendríticas alogénicas que apoyan indirectamente la respuesta antitumoral. Una táctica diferente para aprovechar la respuesta de GvH sería redirigirla contra el tumor mismo. Dado que el tumor es de origen huésped, sin duda es susceptible al ataque de GvH, el desafío es cómo dirigir las células del donante anti-huésped al tumor. Un enfoque interesante empleado por Kim *et al.* (laboratorio de Megan Sykes) fue administrar FTY720 simultáneamente con TMO alogénico para el tratamiento de tumores malignos hematológicos [60]. La razón detrás del tratamiento es que la inhibición de la egresión de los linfocitos de los órganos linfáticos mejorará la GvHD, pero la reacción de GvH en los órganos linfáticos procederá sin impedimentos atacando cualquier tumor maligno hematológico en esos órganos. Al usar este enfoque, se produce GvHD, pero se limita a los órganos linfáticos que también son el sitio del tumor [60]. Si bien este enfoque es válido para los tumores malignos hematológicos, la justificación no es válida para los tumores sólidos. Sin embargo, los inventores encontraron que FTY720 aún podría proporcionar un beneficio terapéutico en

un modelo de tumor sólido tratado con células alogénicas. Por supuesto, en el caso de las metástasis ganglionares, atrapar los linfocitos antitumorales en los ganglios linfáticos puede mejorar la eficacia terapéutica, pero este no es el caso en un modelo en el que se producen metástasis en el pulmón fuera del sistema linfático.

5 La cuestión sigue siendo cómo una sustancia que atrapa los linfocitos en los ganglios linfáticos mejora la terapia de un tumor linfático extra. La clave para responder esa pregunta es la constatación de que en la terapia adoptiva alogénica en realidad hay dos objetivos: el tumor y el sistema inmune del huésped. Las células T alogénicas atacan, entre otros tejidos, el sistema inmune del huésped, debilitándolo y perjudicando la respuesta HvG. De esta manera, el rechazo de células alogénicas presumiblemente se retrasa potenciando así la eficacia del efecto antitumoral al prolongar la persistencia de los linfocitos antitumorales fuera de los ganglios linfáticos. La incorporación de FTY720 en el protocolo de tratamiento produjo la mejor eficacia terapéutica de cualquiera de los regímenes probados con cuerpos T alogénicos que proporcionan un beneficio terapéutico superior a los cuerpos T singénicos.

15 Aunque existen muchas terapias que dependen de células alogénicas, la gran mayoría de ellas dependen de la reactividad de GvH (por ejemplo, DLI) o del reconocimiento independiente de TCR (por ejemplo, células CIK) para su eficacia. Existen muy pocas terapias alogénicas que sean específicas del antígeno. Antes de la presente divulgación, no había ningún informe en la literatura de ningún estudio que mostrara una eficacia equivalente entre células singénicas y alogénicas. En la presente divulgación, los inventores no solo mostraron una eficacia equivalente, sino que desarrollaron un protocolo que proporcionó un beneficio superior con células alogénicas mediante el redireccionamiento de la respuesta de GvH.

25 En resumen, la investigación del presente documento proporciona una prueba de concepto de terapia de células adoptivas alogénicas. La combinación de células T alogénicas con un receptor quimérico no restringido por MHC produce "células efectoras universales" que podrían usarse como una terapia estandarizada del cáncer. El tratamiento no incluyó el uso de TMO, y por lo tanto evita la toxicidad y la morbilidad significativas asociadas con él, así como la necesidad de encontrar un donante compatible, lo que hubiera impedido su uso como terapia universal. Finalmente, la presente divulgación demostró que la adición de FTY720 puede inhibir la GvHD, al tiempo que mejora la eficacia de la respuesta antitumoral. Bajo esta estrategia, los presentes inventores obtuvieron resultados superiores con células alogénicas, en comparación con células singénicas. Aprovechar la respuesta de GvH para aumentar la eficacia de la respuesta antitumoral podría hacer que la terapia adoptiva alogénica fuera el tratamiento de elección no solo por razones logísticas y económicas, sino también por consideraciones de eficacia.

35 Habiendo descrito hasta ahora de forma general las realizaciones de la invención mencionadas anteriormente, las mismas se entenderán más fácilmente por referencia a los siguientes materiales, métodos y ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración, y no están destinados a ser limitativos, a menos que se especifique lo contrario.

#### EJEMPLOS

40 Los siguientes métodos y materiales se usan en varios de los Ejemplos que siguen, así como en la implementación de ciertas realizaciones de la invención.

#### Ejemplo 1: Terapia adoptiva que usa células T alogénicas específicas tumorales "no silenciadas".

45 El fracaso del enfoque del "silenciamiento" llevó a los inventores a buscar estrategias alternativas para evitar el rechazo de las células transferidas. Un método obvio para prevenir el rechazo de las células transferidas es extirpar por completo el sistema inmunitario del huésped y luego rescatar al huésped con trasplante de médula ósea singénico o alogénico (TMO). La principal diferencia entre TMO singénico o alogénico es que el TMO alogénico conlleva el riesgo de GvHD (incluso si el donante es compatible con MHC, que a su vez no es trivial). Sin embargo, en el caso de la ACT alogénica, la diferencia entre el auto-TMO y el alo-TMO es marcadamente borrosa debido a que las células alogénicas transferidas pueden causar GvHD por sí mismas. Por ello, en cualquier caso, el mayor obstáculo que enfrenta el enfoque de linfoblación es el riesgo de GvHD. Se supuso que el uso de un precondicionamiento leve podría ser suficiente para crear una ventana de tiempo terapéutico en la que las células transferidas pudieran atacar el tumor, pero insuficiente para causar GvHD grave. Este enfoque es único porque se basa en la suposición de que una respuesta antitumoral suficientemente potente podría conferir un beneficio terapéutico significativo a pesar de la persistencia limitada, en marcado contraste con la visión predominante que enfatiza la importancia de la persistencia [2].

#### Ejemplo 2: GvHD está en función del precondicionamiento del huésped y la dosis celular.

60 Está bien establecido que incluso una cantidad minúscula de células T alogénicas presentes en la MO es suficiente para causar GvHD letal, pero el riesgo de GvHD no se ha evaluado usando protocolos de acondicionamiento más suaves. Lo ideal sería inducir la respuesta antitumoral más potente sin arriesgarse a la GvHD. Con ese fin, los inventores precondicionaron a los ratones con cantidades crecientes de radiación seguidas de transferencia con cantidad variable de células, con el fin de encontrar los regímenes de transferencia adoptiva más potentes que

eviten la GVHD. Los inventores usaron células T activadas C57BL/6-N29 como donantes y ratones Balb/c como receptores. Las células T se activaron *in vitro* con concanavalina A (conA) durante 48 horas, y luego se expandieron con IL-2 durante un periodo de hasta 5 días. La activación es crítica ya que los inventores planificaron redirigir las células T contra el tumor (en experimentos posteriores y en la clínica) usando la transducción retroviral con el TPCR (que solo infecta células proliferantes). Las células se transfirieron un día después de la radiación, y si se transfirieron >30 millones, entonces las células se administraron en dos dosis iguales. La Figura 6 muestra que la dosis de radiación (grado de ablación) es más importante que la dosis celular para determinar el riesgo de GVHD. No se produjo mortalidad y solo pérdida de peso transitoria por la administración de un número muy elevado de células (100 millones de células) después de la radiación con 200 rads (abreviado como el régimen 200/100). En contraste, la administración de solo 50 millones después de la radiación con 400 rads (abreviado como el régimen 400/30) causó el 100 % de mortalidad asociada al GVHD.

Ejemplo 3: Los cuerpos T alogénicos transgénicos son tan efectivos como los cuerpos T singénicos transgénicos y superiores a las células alogénicas no modificadas en un modelo de enfermedad residual mínima del cáncer.

Después de determinar los regímenes seguros para la transferencia adoptiva, los inventores probaron la eficacia del rechazo tumoral mediante células T redirigidas con CR. Los inventores usaron la línea celular de cáncer renal Renca-erbb2, transfectada establemente con erbB2 (HER2) que se inyectó por vía intravenosa en ratones Balb/c para generar metástasis pulmonares experimentales. Como efectores, los inventores usaron esplenocitos de ratones transgénicos que expresan un receptor quimérico específico de HER2 (basado en el scFv derivado de anticuerpos N29, **Figura 7A-B**) bajo el promotor CD2 (que se expresa en células T y NK [8]). Los ratones transgénicos específicos de HER2 se mantuvieron en dos fondos: C57B1 y Balb/c (denominados C57B1-N29 y Balb-N29, respectivamente). Ratones Balb/c de tipo salvaje se inyectaron con Renca-erbb2 el día 1, se radiaron el día 7, y se inyectaron cuerpos T específicos de HER2 el día 8 (y también los días 10 y 12 en algunos casos). Se eligió la radiación para el precondicionamiento porque Renca es muy resistente a la muerte inducida por la radiación, y es capaz de soportar incluso 900 rad [39]. Por lo tanto, cualquier beneficio terapéutico del tratamiento se deberá a la inmunoterapia y no a la radiación. En nuestro sistema, la radiación con hasta 400 rad no amplió la mediana de la supervivencia de los ratones (50±5 días) con metástasis pulmonares en comparación con los ratones no tratados (**Figura 7D**). En el momento en que se inició el tratamiento (día 8), los ratones presentaron cientos de metástasis pulmonares con un diámetro de 50-100 µm (**Figura 7E**). Este modelo de tumor simula una enfermedad residual mínima, una situación clínicamente relevante en la que se extirpó el tumor primario, pero el tumor ya se había diseminado sistémicamente, dejando micrometástasis por todo el cuerpo.

Para que la terapia adoptiva alogénica sea una opción viable, debe proporcionar al menos una terapéutica comparable a la terapia adoptiva singénica. Por lo tanto, los inventores compararon la eficacia de los cuerpos T alogénicos (C57B1-N29) con los singénicos (Balb-N29) y para asegurar que las células alogénicas mediaran una respuesta antitumoral específica (y no solo una respuesta alogénica), también probaron el efecto de las células C57B1 activadas de tipo salvaje. Experimentos previos en el laboratorio de los inventores han establecido que el régimen mínimo que proporciona un beneficio terapéutico significativo (aumento de la supervivencia media a 90 días) utilizando Balb-N29 singénicos es radiación con 200 rad y transferencia de 3 dosis de 10 millones de células cada una (abreviado como régimen 200/30) complementado con una dosis baja de IL-2 (1000u) dos veces al día. El propósito fue probar si se puede proporcionar un beneficio terapéutico en este modelo usando células alogénicas C57B1-N29. Los inventores usaron el régimen inicial como punto de partida con una diferencia importante: en lugar de utilizar células transgénicas vírgenes, las células se preactivaron antes de la transferencia durante 48 horas con concanavalina A. El motivo del cambio fue simular una situación clínicamente más relevante en la que los linfocitos necesitarán ser activados para facilitar la transducción retroviral con el receptor quimérico. Usando el régimen 200/30, la mediana del tiempo de supervivencia de los grupos tratados Balb-N29, C57B1-N29 y C57B1 fue de 97, 62 y 52 días en comparación con 50 días para el grupo no tratado (**Figura 9**,  $P < 0,0002$  para Balb-N29 versus grupo de control). Bajo estas condiciones, las células singénicas proporcionaron el mejor beneficio terapéutico con C57B1-N29 proporcionando un beneficio muy modesto en comparación con beneficio nulo al usar células salvajes de tipo C57B1. Es importante destacar que el beneficio proporcionado por las células C57B1-N29 se produjo en ausencia de mortalidad o pérdida de peso, lo que demuestra que el beneficio terapéutico usando cuerpos T alogénicos precede al desarrollo de cualquier efecto secundario adverso debido a la respuesta de GvH. Se supuso que el rechazo alogénico limita la eficacia de la terapia adoptiva alogénica y que el aumento de la dosis celular y/o la dosis de radiación aumentaría la persistencia de las células alogénicas, mejorando así el beneficio terapéutico. Con el régimen 200/100, la mediana de supervivencia de los grupos tratados Balb-N29, C57B1-N29 y C57B1 fue de 165, 155 y 70 días, respectivamente, en comparación con una mediana de 43 días en el grupo no tratado (Figuras 10 y 11,  $P < 0,0004$ ,  $0,0004$ ,  $0,0015$  para Balb-N29, C57B1-N29 y grupos C57B1 de tipo salvaje, respectivamente, en comparación con el grupo de control). Según los inventores, esta es la primera demostración de que la terapia adoptiva alogénica puede proporcionar un beneficio terapéutico significativo que es comparable al obtenido por la terapia singénica en un modelo clínicamente relevante de enfermedad residual mínima (sin diferencia significativa entre Balb-N29 y C57B1-N29,  $P = 0,68$ ). Las células C57B1-N29 duplicaron la supervivencia media en comparación con las células alogénicas no modificadas, demostrando que la respuesta inmune es de hecho específica tumoral, y no meramente aloespecífica ( $P < 0,0031$  para el grupo C57B1-N29 vs. el grupo de tipo salvaje C57B1). Si bien este

5 régimen es muy eficaz, los inventores trataron de determinar si el aumento de la persistencia de las células transferidas adoptivamente mejora aún más el resultado. Dado que probablemente no es realista aumentar la dosis celular (más allá de 100 millones), los inventores eligieron aumentar la dosis de radiación a 400 rads. Usando 400 rads y 30 millones de células, la mediana de supervivencia de los grupos Balb-N29, C57B1-N29 y C57B1 fue de 90, 110 y 24 días, en comparación con 50 días para el grupo no tratado (**Figura 10 y 11**,  $P < 0,002$  para los grupos C57B1-N29 y Balb-N29 en comparación con el grupo de control). En estas condiciones, los cuerpos T alogénicos proporcionaron un beneficio ligeramente mayor que los cuerpos T singénicos, lo que demuestra que la dosis de radiación puede de hecho determinar la eficacia relativa de las células alogénicas frente a las singénicas. Como se esperaba, el aumento de la dosis celular o de la dosis de radiación, en comparación con el régimen inicial de 200/30, mejoró la eficacia del tratamiento (resultados de varios experimentos resumidos en la **Tabla 1** que se muestra a continuación).

15 **Tabla 1. Resumen de experimentos de transferencia adoptiva en el modelo de metástasis pulmonares Renca-erbb2**

| Tipo de célula | Dosis celular        | Número de dosis celulares | Dosis de radiación | Número de repeticiones | Mediana | Supervivientes >150 días |
|----------------|----------------------|---------------------------|--------------------|------------------------|---------|--------------------------|
| Control        | 0                    | 0                         | 0-400              | >10                    | 50±5    | 0 %                      |
| Balb-N29       | 10 <sup>7</sup>      | 3                         | 200                | 3                      | 106±15  | 10 %                     |
| C57B1-N29      | 10 <sup>7</sup>      | 3                         | 200                | 3                      | 72±9    | 4,5 %                    |
| C57B1          | 10 <sup>7</sup>      | 3                         | 200                | 2                      | 65*     | 0 %                      |
| Balb-N29       | 10 <sup>7</sup>      | 3                         | 400                | 2                      | 90      | 15 %                     |
| C57B1-N29      | 10 <sup>7</sup>      | 3                         | 400                | 2                      | 111     | 15 %                     |
| C57B1          | 10 <sup>7</sup>      | 3                         | 400                | 2                      | 22*     | 0 %                      |
| Balb-N29       | 50 * 10 <sup>6</sup> | 2                         | 200                | 3                      | 156±9   | 33 %                     |
| C57B1-N29      | 50 * 10 <sup>6</sup> | 2                         | 200                | 3                      | >137,5§ | 33 %                     |
| C57B1          | 50 * 10 <sup>6</sup> | 2                         | 200                | 2                      | 68*     | 0 %                      |

20 **Todos los grupos contenían 6 ratones.**

\* - Promedio de dos experimentos

§ - Los experimentos todavía están en curso (día>250), y en algunos grupos no se alcanzó la mediana.

Curiosamente, el aumento de la dosis celular fue más efectivo que el aumento de la dosis de radiación (el régimen de 200/100 fue más efectivo que el régimen de 400/30, medianas de 155 y 110 días respectivamente (**Figura 11C**), además también fue más seguro, lo que sugiere que un régimen de dosis celular alta es la mejor opción para la terapia adoptiva alogénica en este modelo.

Ejemplo 4: los cuerpos T transducidos se comportan de manera similar a los cuerpos T transgénicos

Si bien los cuerpos T de animales transgénicos son útiles, no simulan completamente un escenario del mundo real en el que las células T tengan que ser transducidas con el receptor quimérico. Por lo tanto, los inventores repitieron el régimen 200/100, pero esta vez en lugar de usar cuerpos T transgénicos, transdujeron células C57B1 o Balb/c de tipo salvaje con retrovectores que expresan el receptor N29 quimérico después de la activación (esta vez con los anticuerpos CD3/CD28 más clínicamente relevantes en lugar de conA). A diferencia de las células transgénicas que expresan uniformemente el receptor quimérico, solo el 50 % de las células transducidas (tanto para Balb/c como para C57B1) expresan el receptor quimérico (**Figura 12A-B**). Si bien los resultados aún son preliminares, sí sugieren que C57B1-N29 es al menos tan eficaz como Balb-N29 (y tal vez incluso más), y ambos son significativamente más efectivos que los controles no tratados de acuerdo con los presentes hallazgos utilizando cuerpos T transgénicos (**Figura 12C**). Con el fin de mostrar que los cuerpos T transgénicos funcionan de forma similar a los cuerpos T transducidos, los inventores realizaron una comparación directa de los dos tratamientos. En el mismo experimento, los inventores también incluyeron un grupo de ratones que se trataron con cuerpos T transgénicos singénicos o alogénicos. Inyectaron el mismo número de cuerpos T independientemente de si se usaron cuerpos T transgénicos o transducidos. Añadieron células T de tipo salvaje activadas de la misma cepa a los cuerpos T transgénicos de modo que todos los grupos recibieron el mismo número de cuerpos T. Aunque los resultados son todavía preliminares, los cuerpos T transducidos se desempeñaron de forma similar a los cuerpos T transgénicos (los

resultados no alcanzan significación), lo que demuestra que los cuerpos T transgénicos y transducidos proporcionan un beneficio similar (**Figura 12D**).

Ejemplo 5: la ciclofosfamida puede reemplazar la irradiación como el precondicionamiento para la transferencia adoptiva y permite un tratamiento eficaz con una dosis celular menor.

Si bien la radiación corporal total (TBI) puede ser útil como precondicionamiento para el tratamiento, no es la única manera de linfodeplecionar al huésped. La quimioterapia y los anticuerpos reductores también son opciones viables para la linfodepleción. La razón para elegir la radiación en este modelo es porque la línea celular de Renca es resistente a ella y, por lo tanto, el beneficio terapéutico se debe únicamente a la inmunoterapia más que a la radiación. En contraste, experimentos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la línea celular de Renca es algo sensible a la quimioterapia, y específicamente a la ciclofosfamida. En un escenario del mundo real, el daño al tumor es en realidad un atributo deseable del precondicionamiento. Los inventores, por lo tanto, trataron de simular una situación clínicamente más relevante, y reemplazaron TBI con ciclofosfamida como un tratamiento de linfodepleción. Cuando se inyectó ciclofosfamida a 200 mg/kg, seguido de 100 millones de células C57B1 hubo 100 % de mortalidad debido a GvHD letal, por lo que los inventores decidieron usar una dosis más pequeña de 20 millones de células que era completamente segura (datos no mostrados). A los ratones se les inyectó el tumor el día 1, ciclofosfamida (200 mg/kg) el día 7. Las células T de tipo salvaje C57B1 y Balb/c se transdujeron con el receptor quimérico N29 y se inyectaron 10 millones de células en los días 8 y 10. Aunque los resultados son todavía preliminares, existe una ventaja de supervivencia decisiva tanto para los cuerpos T alogénicos como para los singénicos sobre los ratones no tratados (inyectados solo con ciclofosfamida), proporcionando los cuerpos T alogénicos resultados superiores sobre los cuerpos T singénicos (**Figura 13A**). Las células T C57B1 de tipo salvaje también proporcionan un beneficio terapéutico, pero no tanto como los cuerpos T alogénicos, lo que confirma que la respuesta es de hecho específica tumoral y no es alo-específica. Los inventores también compararon cuerpos T transgénicos y transducidos usando este protocolo, y de nuevo no hubo diferencia significativa entre los cuerpos T, independientemente de si eran singénicos o alogénicos del huésped (**Figura 12D**). Estos resultados demuestran una vez más que la eficacia de las terapias de transferencia adoptivas alogénicas depende tanto del grado de linfodepleción como del número de células transferidas, y que el alto número de células puede compensar los bajos niveles de linfodepleción y viceversa. Es importante destacar que estos resultados se lograron a una baja dosis de células (20 frente a 100 millones), que es una dosis celular más práctica.

Ejemplo 6: La transferencia adoptiva de células alogénicas es segura.

Si bien no hubo mortalidad debido al régimen 200/100, esto no significa que el tratamiento no causara daño al huésped. Con el fin de evaluar directamente el efecto del tratamiento, se sacrificaron ratones durante varios puntos temporales y se examinaron diversos órganos mediante análisis histológico. La cinética de la pérdida de peso (**Figura 6**), durante el tratamiento, sugiere que el pico de la respuesta ocurre poco después de la inyección de las células (1-3 días después); por lo tanto, los ratones fueron examinados a los días 1 y 3 después de la segunda inyección de células. Un día después de la segunda inyección, no hubo evidencia de GvHD en los pulmones, el hígado, el intestino o los riñones de los ratones (**Figuras 14A-D**). Tres días después de la segunda inyección, se observó un punto temporal correspondiente al pico de la pérdida de peso, la infiltración de linfocitos en los pulmones, el hígado y el intestino, pero no en los riñones (**Figura 14E-H**). No había signos de daño en ninguno de los otros tejidos examinados. En general, la evidencia sugiere que, si bien los linfocitos se infiltran en los órganos periféricos, no causan un daño significativo.

Ejemplo 7: Las células alogénicas no modificadas de diferentes cepas de ratón proporcionan un beneficio terapéutico similar.

Aunque las células alogénicas C57B1 de tipo salvaje fueron menos efectivas que las células alogénicas transgénicas C57B1-N29 en este modelo tumoral, todavía proporcionaron algún beneficio en el régimen 200/100. Se comparó la eficacia terapéutica de las células de 3 cepas diferentes (C57B1, FVB y C3H) (**Figura 15**). Todas las cepas proporcionaron algún beneficio terapéutico extendiendo la mediana de supervivencia a 64,5, 60,5 y 56,5 días para C57B1, FVB y C3H en comparación con 43 días para los grupos de control ( $P < 0,0004$  para todos los grupos en comparación con el grupo de control, pero no hubo diferencias significativas entre las cepas). Las diferencias entre las cepas no son sorprendentes, lo que refleja alo-respuestas de diferente intensidad entre las diferentes combinaciones de cepas. Es importante destacar que, a pesar de estas diferencias, todas las cepas proporcionaron beneficios terapéuticos significativos (pero modestos), lo que destaca la solidez de este enfoque. Las células alogénicas no modificadas podrían usarse potencialmente en casos en los que no se conoce ningún antígeno específico tumoral.

Ejemplo 8: Migración y persistencia de células transferidas adoptivamente *in vivo*.

Para dilucidar la dinámica de ACT alogénica, se utilizaron imágenes de bioluminiscencia *in vivo* para estudiar la migración y la persistencia de células T Luciferasa<sup>+</sup> en ACT (ratones transgénicos FVB-Luc fueron amablemente

donados por el Profesor Reisner [40]). Un día después de la radiación con 200 rads, los inventores inyectaron  $10^8$  células T activadas por FVB-Luciferasa<sup>+</sup> (que no expresan un receptor quimérico) en Balb/c portadores de metástasis pulmonares de Renca-erbB2 establecidas durante 7 días. Las células transferidas pudieron detectarse en todo el cuerpo hasta el día 6, y las emisiones máximas se produjeron entre 3 y 4 días después de la primera inyección y se redujeron en 10 veces en los días 5 a 6 (**Figura 16**). Las células transferidas se acumularon preferentemente en los ganglios linfáticos y la región abdominal (probablemente reflejando ganglios linfáticos mesentéricos e inguinales), según se midió por el aumento de 10 veces en la emisión de fotones de estas áreas en comparación con otros tejidos (**Figura 16**). Los días 5-6 la mayoría de las células se detectaron en los ganglios linfáticos, el área abdominal y la médula ósea; luego se detectaron señales intermitentes solo en los ganglios linfáticos y en el área abdominal hasta el día 9 (**Figura 16**). Estos datos muestran que, al usar este régimen, las células alogénicas sobreviven durante aproximadamente 5-6 días *in vivo*, y luego son rechazadas. Aunque estas células T se originan a partir de una cepa diferente a los experimentos previos (FVB vs. C57BL), son en cualquier caso alogénicas al huésped Balb/c (incompatibilidad completa de MHC), y por lo tanto su dinámica *in vivo* debería asemejarse mucho a las de las células T C57BL. Si bien su rechazo limita su efectividad *in vivo*, también proporciona una importante medida de seguridad en el sentido de que las células manipuladas genéticamente no persisten *in vivo* durante mucho tiempo. Con el fin de determinar con precisión la localización de las células transferidas, los ratones se sacrificaron 1 día después de la transferencia adoptiva de 50 millones de células FVB-Luc en ratones Balb/c, y sus órganos se examinaron individualmente. Las células se detectaron en el pulmón, hígado, bazo y ganglios linfáticos (cervical e inguinal) de los ratones receptores (**Figura 17A-B**), de acuerdo con los datos de histología (**Figura 14**). Este patrón de migración es muy adecuado para el tratamiento de la enfermedad metastásica, ya que los LN, el pulmón y el hígado son los sitios más comunes de diseminación metastásica. La migración a los ganglios linfáticos fue particularmente interesante porque requiere la expresión de las moléculas receptoras de la linfa que, según se informó, se regulan de manera descendente después de la activación. Los esplenocitos activados que se sometieron al protocolo estándar (activación durante 48 horas, seguida de cultivo en IL-2 durante 5 días) se tiñeron para la expresión de CD62L y CD44. De manera bastante inesperada, el 30 % de las células T expresaron un fenotipo virgen (CD62L<sup>+</sup>, CD44<sup>low</sup>), el 40 % expresaron un fenotipo de memoria central (CD62L<sup>+</sup>, CD44<sup>high</sup>), y solo el 20 % expresaron el esperado fenotipo de memoria efectora (CD62L<sup>-</sup>, CD44<sup>high</sup>) (**Figura 17C**). La alta proporción de células relativamente indiferenciadas podría ser el resultado del corto período de activación que se utilizó (48 horas). Los protocolos alternativos que conducen a la expansión de células de memoria efectora usan tiempos de propagación ampliados (más de una semana) con activación continua (ya sea mediante la presencia de APC cargadas con péptidos o microesferas anti-CD3).

Ejemplo 9: FTY720 puede mejorar la GvHD de los cuerpos alo-T al mismo tiempo que potencia la respuesta antitumoral.

La GvHD se produce cuando las células del donante abruma el sistema inmune del huésped en los ganglios linfáticos, y luego proceden a atacar los tejidos periféricos [13, 14]. FTY720 es un compuesto inmunomodulador que atrapa las células T en los ganglios linfáticos al evitar su salida a la sangre, y se ha demostrado en ensayos clínicos que prolonga la supervivencia de los aloinjertos renales [19, 41]. Se formuló la hipótesis de que la captura de linfocitos del donante en los órganos linfáticos también puede ser una estrategia eficaz para prevenir la GVHD, como se confirmó recientemente en algunos estudios [42, 43]. La terapia adoptiva alogénica puede potencialmente causar GVHD y, por lo tanto, podría potencialmente beneficiarse de la adición de FTY720. Para estudiar cómo estos agentes afectan la respuesta antitumoral alogénica y la respuesta de la GvH, los inventores agregaron 10 inyecciones diarias de FTY720 (después de la radiación) al régimen 400/30 que causa GvHD letal cuando se usan células T C57B1 de tipo salvaje. La adición de FTY720 evitó significativamente la mortalidad por GVHD en este régimen: en el grupo tratado con células C57B1 de tipo salvaje activadas (2/6 ratones murieron con FTY720 en comparación con 5/6 sin FTY720, **Figura 18A**). Al mismo tiempo, no solo conservó la eficacia antitumoral en el grupo tratado con C57B1-N29, sino que la mejoró significativamente desde una mediana de 111 días sin FTY720 a una mediana que no se alcanzó en el grupo tratado con un 50 % o más sobreviviendo después del día 250, **Figura 18A**). Es importante señalar que la muerte por GvHD podía distinguirse fácilmente de la muerte causada por el tumor. La GvHD causó una dramática pérdida de peso, así como una postura encorvada, y fue confirmada por cirrosis hepática post-mortem. Todos los ratones que murieron antes del día 45 murieron de GvHD, mientras que todos los ratones que murieron después del día 45 murieron a causa del tumor sin mostrar ningún signo de GvHD pre o postmortem. El hecho de que la adición de FTY720 mejoró la supervivencia en el grupo de cuerpo T alogénico, aunque no hubo muertes relacionadas con GvHD en este grupo incluso antes de la adición de FTY720, indujo a los inventores a probar el efecto de FTY720 en el régimen 200/100 (en el que no se produce GvHD). En el régimen 200/100 FTY720 aumentó el beneficio terapéutico proporcionado por C57B1-N29 (un 80 % de supervivientes a largo plazo con FTY720 frente a un 50 % de supervivientes a largo plazo sin FTY720, **Figura 18B**), pero no por Balb-N29, o C57B1 de tipo salvaje. Los datos de imágenes *in vivo* demuestran que FTY720 puede de hecho prolongar la persistencia *in vivo* de cuerpos T alogénicos (**Figura 20**). El hecho de que FTY720 inhibiera selectivamente la respuesta de GvH pero no la respuesta antitumoral debería alentar nuevos estudios sobre el uso de FTY720 en sí mismo o de agentes similares para reducir la GvH y mantener las respuestas de GvT utilizando células T no compatibles para la inmunoterapia del cáncer.

## EJEMPLO 10

Los experimentos en este Ejemplo se realizaron usando los materiales y métodos descritos a continuación.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y líneas celulares. FTY720 se adquirieron de Caymen Chemicals (Ann Arbor, Michigan). Los tumores se indujeron utilizando la línea celular Renca transducida con Her2/neu humana amablemente proporcionada por el Profesor W. Wels (Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus).

10 Citometría de flujo. Anti-mouse CD3 $\epsilon$  (145-2C11)-Percp-Cy5.5, anti-mouse CD62L (MEL14)-PE-Cy7, y anti-mouse H-2Kb (AF6-88.5)-Pacific Blue se adquirieron de Biolegend (San Diego, CA). PE-Anexina V, Estreptavidina-APC y Estreptavidina-APC-Cy5.5 se adquirieron en eBioscience (San Diego, CA). El anticuerpo policlonal contra el N29 CAR se generó en el laboratorio de los presentes inventores y luego se biotiniló.

15 Antes de la tinción de esplenocitos, los RBC fueron lisados usando tampón ACK. Los linfocitos (1x10<sup>6</sup>) se incubaron con los anticuerpos apropiados en tampón de tinción (BSA al 5 %, azida sódica al 0,05 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS)) durante 30 minutos en hielo. Alternativamente, se usó tampón de tinción de Anexina V, tal como se indica. El marcado CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Probes, Eugene, Oregón). Las células se analizaron mediante citometría de flujo (LSRII, Becton Dickinson, Mountain View, CA) y el software FacsDiva (Becton Dickinson).

25 Ratones. Los animales portadores de tumores usados en los experimentos fueron generalmente ratones Balb/c de 8-10 semanas de edad. Se obtuvieron esplenocitos donantes de ratones transgénicos de 6-16 semanas de edad que expresaban el N29 CAR en el fondo C57BL/6 (allogénico) o Balb/c (singénico). Se obtuvieron ratones transgénicos de luciferasa C57BL/6 y Balb/c (amablemente recibidos del Profesor R. Negrin, ref. 70) por retrocruzamiento de FVB-Luciferasa a estas cepas durante al menos 9 generaciones. Los ratones transgénicos de Luciferasa se cruzaron luego con ratones transgénicos N29, y se usaron ratones F1 como donantes en estudios de IVIS. Todos los procedimientos invasivos y los experimentos de imagen se realizaron bajo anestesia general con ketamina y xilazina (127,5 y 4,5 mg/kg, respectivamente). Todos los estudios en animales se realizaron bajo protocolos aprobados por el *Weizmann Institute of Science Animal Use Committee* (Comité sobre Uso Animal del Instituto Weizmann de la Ciencia).

35 Transducción retroviral de células T. La transducción retroviral de células T se realizó como se describió anteriormente (ref. 71). Brevemente, las células T activadas se transdujeron usando infección por centrifugación sobre placas recubiertas con RetroNectina (Takara, Japón) en presencia de sobrenadante que contiene vector e IL-2.

40 Experimentos de transferencia adoptiva. Los ratones se inyectaron con 10<sup>5</sup> células Renca-Her2/neu iv el día 1. Todos los ratones (incluido el grupo de control) se radiaron el día 7 con 200 o 400 rads (fuente 137Cs). Antes de la transferencia, todas las células T se activaron con Con-A 1 $\mu$ g/ml durante 48 horas, y luego se cultivaron durante 3-5 días más con 350 u/ml de IL-2. Se transfirieron 30x10<sup>6</sup> o 10<sup>8</sup> células T en una dosis dividida los días 8 y 10. En algunos experimentos, se inyectó FTY720 por vía ip (0,3 mg/kg) los días 8-18. Las células donantes eran de ratones de tipo salvaje (Balb/c o C57BL/6) o de ratones transgénicos N29 CAR (fondos Balb/c o C57BL/6). En algunos casos, los cuerpos T de ratones de tipo salvaje (Balb/c o C57B1) se transdujeron con el CAR.

50 Imagen *in vivo*. Para seguir el tráfico de células, se utilizó el sistema de cámara CCD refrigerado por todo el cuerpo (Sistema de obtención de imágenes IVIS® Serie 100) de Xenogen (Hopkinton, MA). Se utilizaron células T de ratones C57BL/6-N29+/-/Luc+/- o Balb/c-N29+/-/Luc+/- en la transferencia adoptiva. Se inyectó luciferina a 75 mg/kg y las imágenes se adquirieron a baja resolución con un tiempo de exposición de 3-5 minutos. Para el análisis *ex vivo*, los ratones se inyectaron primero con luciferina a 150 mg/kg. La cuantificación de la luminosidad media se realizó con el software Living Image.

55 Análisis estadístico. Todos los resultados en este estudio se basaron en estadísticas de pruebas dobles. El análisis de supervivencia se realizó utilizando la prueba log rank. Los valores P de experimentos independientes se combinaron usando el método de Fisher. Las señales de bioluminiscencia se compararon usando la prueba de Mann-Whitney. El análisis FACS se realizó usando la prueba de chi-cuadrado. P<0,05 se consideró significativo.

60 RESULTADOS**El precondicionamiento del huésped y la dosis celular transferida determinan el beneficio antitumoral**

Para investigar el potencial de la terapia con células adoptivas alogénicas, se usó la línea celular de carcinoma de células renales de ratón (Renca) derivada de BALB/c que expresa la Her2/neu humana. Después de la inoculación

intravenosa del tumor, las metástasis experimentales se desarrollaron principalmente en los pulmones, sin embargo, como se informó en sistemas similares (referencia 62, 63) también se desarrollaron metástasis extrapulmonares. Los ratones portadores de tumores fueron linfodeplecionados 7 días después de la inoculación del tumor usando radiación subletal (por ejemplo, 200-400 rad, dosis que no afectaron el desarrollo del tumor). La transferencia adoptiva de células T redirigidas con un receptor de antígeno quimérico específico de Her2/neu ("cuerpos T") se realizó los días 8 y 10 (Figura 21). El CAR está compuesto por un fragmento de scFv derivado del anticuerpo N29 específico de Her2/Neu fusionado a un elemento de coactivación de CD28 y secuencias de señalización de FcRγ (ref. 8). Se ha demostrado que este diseño del CAR puede activar células T vírgenes, así como también inhibir la muerte inducida por activación (AICD, por sus siglas en inglés) (ref. 8). Los cuerpos T se obtuvieron a partir de ratones transgénicos (Tg) de origen BALB/c (Balb-N29) o C57BL/6 (Black-N29), o mediante la transducción de células T de tipo salvaje con un retrovector que alberga el CAR de Her2/neu específico. Las células T transducidas se activaron como parte de su transducción, mientras que las células T transgénicas (Tg) vírgenes también se activaron para facilitar la comparación con las células T transducidas.

Un protocolo de transferencia adoptiva que consiste en radiación con 200 rads seguido de transferencia con 30x10<sup>6</sup> células T transgénicas singénicas (Balb-N29) amplió la supervivencia media de los ratones portadores de tumores a 97 días, en comparación con 50 días para el grupo de control que también se radió (P=0,000004, Figura 22a), aunque no se logró una curación completa de los ratones portadores de tumores. El uso de este protocolo con los cuerpos T alogénicos (Black-N29) no proporcionó ninguna ventaja de supervivencia (Figura 22a). Los presentes inventores postularon que, en estas condiciones, la reacción huésped frente a injerto (HvG) era dominante, lo que conducía a un rechazo rápido de los cuerpos T alogénicos. Con una dosis celular incrementada (200 rads y 100x10<sup>6</sup> cuerpos T), los alo-cuerpos T ampliaron la mediana de supervivencia en comparación con los cuerpos T singénicos (162,5 y 160 días respectivamente) en comparación con solo 46,5 días para el grupo de control (P=0,000004 tanto para los cuerpos T alogénicos como para los cuerpos T singénicos frente a control, Figura 22b). La reducción del rechazo del injerto al aumentar la linfodeplección (400 rads) y el uso de las dosis celulares más bajas (30x10<sup>6</sup>) aumentó la supervivencia media de los ratones portadores de tumores tratados con cuerpos T alogénicos a 105 días, de forma similar a los cuerpos T singénicos (mediana de 95 días) y más que la mediana de 50 días del grupo de control (P=0,000004 para los cuerpos T alogénicos y singénicos frente al control, Figura 22c). Es importante destacar que no se produjo mortalidad asociada con GvHD utilizando ninguno de los protocolos, lo que demuestra que una respuesta del cuerpo T alogénico puede proporcionar un beneficio terapéutico sin toxicidad significativa para el huésped. Sin embargo, el aumento tanto de la dosis celular como de la dosis de radiación (400 rads y 100x10<sup>6</sup> cuerpos T), causó GvHD letal (que fue precedida por pérdida de peso e hipoplasia linfoide, datos no mostrados) en todos los ratones que recibieron cuerpos alo-T (Figura 22d).

### **Tanto el CAR como la alo-reactividad basada en TCR aumentan la respuesta antitumoral.**

Para evaluar la contribución de CAR a la respuesta del cuerpo T alogénico en condiciones realistas, se transdujeron células T de tipo salvaje BALB/c y C57BL/6 (normalmente con una eficacia de transducción del 50 %) con CAR N29 y su respuesta antitumoral se comparó con células T C57BL/6 transducidas de manera simulada en ratones portadores de tumores Renca-Her2/neu. Las células T alogénicas con transducción simulada pudieron prolongar la supervivencia media de los ratones portadores de tumores a 71 días en comparación con los solo 50 días para el grupo de control (P=0,001 para células T alogénicas frente a control, Figura 23) demostrando que las células T alogénicas no específicas pueden proporcionar algún beneficio terapéutico por sí mismas. No obstante, los cuerpos alo-T fueron más efectivos que las células T alogénicas transducidas simuladas, y fueron capaces de prolongar la supervivencia media a 150 días (P=0,0005 cuerpos T alogénicos vs. células T alogénicas no redirigidas, Figura 23); por lo tanto, la redirección a través de CAR potencia la terapia alogénica. Los cuerpos T alogénicos también fueron superiores a los cuerpos T singénicos, que prolongaron la supervivencia media a solo 106 días (P=0,012 para cuerpos T alogénicos frente a cuerpos T singénicos, Figura 23). En el mismo experimento, comparamos los cuerpos T transducidos con los cuerpos T transgénicos. Se transfirieron números iguales de cuerpos T Tg con la adición de células T de la cepa salvaje para simular el 50 % de la eficacia de transducción de los cuerpos T transducidos. No hubo una diferencia significativa entre el beneficio de supervivencia de los cuerpos T transducidos frente a los transgénicos (Figura 23). Estos datos demuestran directamente que la adición de células T alogénicas no redirigidas puede potenciar la ACT alogénica.

### **La alorreactividad modula la migración y la persistencia de las células alogénicas.**

Para comprender la dinámica de la respuesta del cuerpo T en las condiciones descritas anteriormente, cuerpos T luciferasa+ (obtenidos del cruce de ratones N29-Tg con ratones Luciferasa-Tg del mismo origen) se transfirieron a ratones que portaban Renca-Her2/neu y las células marcadas se controlaron usando el sistema de formación de imágenes *in vivo* (IVIS). Cambiar el número de células transferidas y la dosis de radiación del huésped no alteró significativamente la migración o la persistencia de los cuerpos T singénicos (Fig. 24a), pero tuvo un efecto notable sobre los cuerpos alo-T (Figura 24a). En las dosis más bajas de células y radiación (200 rads y 30x10<sup>6</sup> células) no se pudieron detectar los cuerpos T alogénicos, lo que sugiere que fueron rechazados rápidamente (Figura 24a). A una dosis celular más alta (200 rads y 100x10<sup>6</sup> células), 1 día después de la transferencia, la señal bioluminiscente

(BLI) de cuerpo entero de los cuerpos alo-T fue más alta que la de los cuerpos T singénicos ( $P=0,005$ , Figura 24b). Sin embargo, la señal celular alogénica decayó hasta que se volvió indetectable 7 días después de la transferencia celular, en contraste con la señal singénica que persistió durante la duración del periodo de observación (20 días). Estos datos demuestran la dominancia parcial de la respuesta HvG después de la radiación con 200 rads. Por el contrario, inhibir aún más el HvG aumentando la dosis de radiación a 400 rads (manteniendo la dosis de la célula constante a  $30 \times 10^6$ ) cambió la dinámica de la respuesta a una con forma de campana (Figura 24a-b). Durante la primera semana, la señal BLI de las células alogénicas aumentó, seguido de un declive gradual que refleja la eliminación mediada por HvG (Figura 24a). Usando este protocolo, la señal de las células alogénicas fue más fuerte que la señal singénica el día 7 ( $P=0,005$ , Figura 24b) y más débil el día 14 ( $P=0,002$ , Figura 24b). Como se esperaba, el aumento de la linfodepleción (usando una dosis de radiación más alta) permitió que los cuerpos T alogénicos persistieran más tiempo *in vivo* (Figura 24a-b). La persistencia transitoria de cuerpos alo-T usando cualquiera de los protocolos explica la ausencia de toxicidad relacionada con GvHD grave en estas condiciones. La dinámica de las células alogénicas sugirió que se sometieron a la proliferación guiada por GvH. Para verificar esto, el experimento se repitió, pero usando en su lugar células T luciferasa+ marcadas con CFSE; la tinción con un anticuerpo antiidiotípico para el CAR permitió la identificación de los cuerpos T transferidos. El análisis FACS de esplenocitos en el día 4 después de la transferencia demostró que un subconjunto de los cuerpos T alogénicos, pero no singénicos, se sometió a una proliferación extensa (Figura 24c). Además, esta proliferación se asoció con la pérdida de expresión de CD62L ( $P=0,0001$ , Figura 24d) en células T esplénicas, lo que indica que las células T se diferenciaron a células de memoria efectora.

### **FTY720 aumenta la terapia adoptiva alogénica pero no singénica**

A continuación, los inventores trataron de determinar si la modulación de la migración de linfocitos mediante el uso de FTY720 puede aumentar el beneficio terapéutico de los cuerpos T. En primer lugar, se demostró que la adición de FTY720 al protocolo de tratamiento durante un tiempo corto (0,3 mg/kg i.p. durante los primeros 10 días después de la radiación) no afecta la supervivencia de los ratones portadores de tumores (datos no mostrados). Luego se verificó el efecto de FTY720 en la transferencia adoptiva de cuerpos T singénicos y alogénicos (400 rads y  $30 \times 10^6$  cuerpos T). Mientras que FTY720 no tuvo ningún efecto notable sobre la terapia con cuerpo T singénico (mediana de supervivencia de 95 días sin FTY720 en comparación con 90 días con FTY720, Figura 25a), tuvo un profundo efecto sobre la terapia con cuerpo alo-T, con un 58 % de ratones que sobrevivieron a largo plazo (> 350 días) con FTY720, a diferencia de solo un 8 % sin él ( $P=0,013$ , Figura 25a). Al final del periodo de observación (> 350 días) se realizó la autopsia de todos los ratones y se descubrió que no tenían tumores. Para investigar el mecanismo de acción de FTY720, se probó su efecto sobre los cuerpos T luciferasa+ en ratones portadores de tumores. De acuerdo con los datos de supervivencia, FTY720 no pareció alterar significativamente la migración o la persistencia de los cuerpos T singénicos (Fig. 25b). Sin embargo, FTY720 sí impactó en la respuesta inmune alogénica, de modo que la señal de BLI de estos ratones fue mayor, especialmente de los órganos linfáticos, y persistió durante un tiempo más prolongado (Figura 25b-d).

Estos datos se confirmaron mediante análisis FACS que muestra que FTY720 inhibió la egrésión de linfocitos a la sangre (Figura 25e), causando así una mayor acumulación en los órganos linfáticos (Figura 25f). Además, el análisis FACS también confirmó que FTY720 potenciaba la persistencia de las células T alogénicas *in vivo*, con un mayor número de cuerpos alo-T detectados en el bazo el día 7 (Figura 25g). Esta persistencia mejorada de los cuerpos T alogénicos puede explicar el aumento de la supervivencia de los ratones portadores de tumores tratados con cuerpos T alogénicos y FTY720.

Cuando se probó el efecto de FTY720 en un protocolo que generalmente causa GvHD letal (manifestada por caquexia grave) en el 100 % de los ratones (400 rads y 108 cuerpos alo-T, Figura 22d), solo el 16 % de los ratones murieron de GvHD (Figura 25h,  $P=0,005$ ). Además, la mayoría de los ratones restantes sobrevivieron a largo plazo (> 350 días), lo que demuestra que FTY720 puede inhibir simultáneamente la GvHD al tiempo que permite que la respuesta antitumoral continúe.

### **DISCUSIÓN**

En este estudio, se demostró que el uso de células T alogénicas de repertorio abierto redirigidas genéticamente es una alternativa segura y eficaz a las células T singénicas tumorales diseminadas. A pesar de la persistencia solo transitoria en ratones radiados sub-letalmente, los cuerpos alo-T proporcionaron tanto beneficio terapéutico como las células singénicas, cuando se transfirieron cantidades suficientes de cuerpos T, y no fueron acompañados por GvHD letal (Figura 22b-c). Los cuerpos alo-T fueron superiores a las células T alogénicas no redirigidas, lo que resalta la importancia y la potencia del CAR (Figura 23). La reactividad GvH de las células T alogénicas moduló la respuesta inmune haciendo que estas células proliferaran extensamente y se diferenciaron a células efectoras (Figura 24). Cuando se inhibió la salida de linfocitos mediante la adición de FTY720 al protocolo de tratamiento, los cuerpos alo-T proporcionaron un beneficio terapéutico de larga duración, en contraste con las células singénicas (Figura 25a).

El resultado de la respuesta del cuerpo T depende de las dos especificidades del cuerpo T: el CAR y el TCR endógeno. El equilibrio entre la actividad antitumoral y la actividad anti-huésped determinó el éxito de esta modalidad. Es importante destacar que todos los cuerpos T pueden reconocer el tumor, pero solo una fracción de los cuerpos alo-T tienen reactividad GvH (Figura 24). Además, se ha demostrado que la incorporación del elemento de señalización CD28 en el CAR activa la bcl-xL, reduciendo de este modo el AICD asociado a CAR, en comparación con el TCR endógeno (ref. 8). Las mejoras en el CAR tales como la incorporación de elementos coestimuladores adicionales (por ejemplo, 4-1BB, ref. 10, 61) pueden aumentar aún más la potencia y la persistencia de los cuerpos alo-T, mejorando así la respuesta del injerto frente al tumor (GvT) sin aumentar el riesgo de GvHD.

El riesgo de GvHD limita el número de cuerpos alo-T que podrían transferirse de forma segura, pero la reactividad GvH inherente de estas células también podría potenciar la ACT. La reactividad de GvH estimuló a los cuerpos alo-T *in vivo*, y causó proliferación sustancial (Figura 24) en ausencia de vacunación o altas dosis de IL-2. La proliferación guiada por GvH es una posible explicación de por qué los cuerpos alo-T fueron capaces de proporcionar un beneficio terapéutico similar al de los singénicos (Figura 22b-c) a pesar de la persistencia limitada (Figura 24). Sin embargo, la estimulación *in vivo* puede potenciar la ACT a través de mecanismos distintos a la proliferación mejorada. En un estudio reciente, Pule *et al.* demostraron que los cuerpos T autólogos específicos de GD2 derivados de CTL anti-EBV persistieron durante más tiempo que los cuerpos T derivados de células T policlonales en pacientes con infección latente de EBV, lo que demuestra la contribución a la persistencia de la estimulación antigénica *in vivo* (ref. 12).

Solo ha habido un pequeño número de estudios sobre el uso de células alogénicas sin HCT alogénico. Uno de tales estudios, que fue llevado a cabo por Boni *et al.*, comparó la actividad antitumoral de las células T TCR transgénicas vírgenes haploidénticas singénicas o alogénicas que expresan el TCR pmel en un modelo de melanoma experimental (ref. 30). Los autores demostraron que el TCR pmel no poseía alorreactividad frente a las otras cepas de ratón que se analizaron (ref. 30). La radiación mieloablativa de los ratones a (900 rads) retrasó el rechazo de células T alogénicas que pudieron causar la regresión de tumores establecidos. Sin embargo, las células T alogénicas fueron inferiores a las células T singénicas al causar la regresión del tumor, presumiblemente debido a que las alogénicas fueron eventualmente rechazadas. La adición de células T alogénicas de repertorio abierto a las células T pmel aumentó la regresión del tumor, lo que demuestra que la alorreactividad puede mejorar la respuesta antitumoral de forma similar a los resultados del presente estudio (Figura 23). Sin embargo, la mejora observada en el estudio de Boni se produjo a expensas de una GvHD letal, mientras que, en el presente estudio, utilizando dosis de radiación más leves, no se desarrolló GvHD. Esta contribución de la alorreactividad a la respuesta antitumoral también puede ayudar a explicar por qué en el presente estudio las células T alogénicas proporcionaron un beneficio comparable a las células T singénicas.

La estrategia de los presentes inventores para la ACT alogénica dependía de la explotación de la respuesta de GvH para aumentar la terapia. Sin embargo, este enfoque también puede beneficiarse de la reducción de la frecuencia de las células T alo-reativas, lo cual puede permitir la transferencia de más células T alogénicas, o de una mayor radiación antes de la transferencia, manteniendo así la respuesta GvH a un nivel seguro, mientras aumenta la potencia del protocolo ACT. Una forma de reducir la frecuencia de células T alo-reativas es usar células T específicas de antígeno que tienen un repertorio de TCR restringido en lugar de células T de repertorio abierto, de manera similar a las células usadas por Boni *et al.* (ref. 30). De hecho, estos dos enfoques no son mutuamente excluyentes, ya que las células T específicas de antígeno pueden transducirse con una especificidad adicional, para expresar un CAR específico tumoral. Si bien la experiencia clínica con células T alogénicas específicas tumorales ha sido muy limitada, se han utilizado con frecuencia líneas de células T alogénicas específicas de virus después de la HTC alogénica para tratar la reactivación viral, generalmente sin causar GvHD grave (ref. 24, 64, 65). Curiosamente, recientemente se ha demostrado que, aunque generalmente no causan GvHD, muchas líneas específicas de virus poseen alorreactividad (ref. 66-68). Estos hallazgos sugieren que la combinación de cuerpos T y células T específicas de antígeno es un enfoque prometedor para la ACT alogénica. La traslación de este enfoque a los pacientes requerirá la incorporación de medidas de seguridad adicionales para tratar el riesgo de GvHD; un posible enfoque es la expresión de genes suicidas por parte de los cuerpos alo-T (ref. 55, 69).

La adición de FTY720 al protocolo de tratamiento aumentó el porcentaje de ratones supervivientes a largo plazo (>350 días) tratados con cuerpos T alogénicos, pero no singénicos, de modo que los cuerpos alo-T proporcionaron un beneficio terapéutico superior sobre los singénicos (Figura 25a). La superioridad de los cuerpos alo-T demuestra que su alorreactividad puede ser explotada para potenciar la ACT. Como se esperaba, FTY720 bloqueó la salida de linfocitos a la sangre, lo que permite una mayor acumulación en los órganos linfáticos (Figura 25d-f). Una posible explicación de cómo FTY720 aumenta el beneficio terapéutico es que, al secuestrar los linfocitos del huésped en los órganos linfáticos, se inhibe la respuesta HvG, y los cuerpos alo-T que ya están en los órganos periféricos en la vecindad del tumor se rechazan más lentamente. Otra posibilidad es que los cuerpos alo-T reactivos de GvH atrapados en los órganos linfáticos ataquen el sistema inmune del huésped, debilitándolo, retrasando así el rechazo de los cuerpos alo-T fuera de los órganos linfáticos. Es importante destacar que, cuando se agregó FTY720 a un protocolo que causa la GvHD letal, inhibió la GvHD sin que se eliminase el beneficio terapéutico; por lo tanto, la adición de FTY720 fue beneficiosa para la ACT alogénica, independientemente de que el protocolo causara o no

GvHD. Sin embargo, el bloqueo de la egresión también puede inhibir potencialmente la eficacia de la inmunoterapia, especialmente cuando se emplea la vacunación y se generan células efectoras en el LN. En virtud de su CAR, los cuerpos T pueden ser activados por las células de los tejidos periféricos que no expresan moléculas coestimuladoras (ref. 8) y, por lo tanto, son menos dependientes de la estimulación por APC en el LN.

Los ganglios linfáticos son uno de los sitios metastásicos más comunes para prácticamente todos los cánceres (tanto sólidos como hematológicos) y la transferencia de cuerpos alo-T es particularmente prometedora para este problema. La proliferación de cuerpos alo-T impulsada por GvH potencialmente puede permitir respuestas extremadamente poderosas contra las metástasis de LN. La administración de FTY720 junto con transferencias de cuerpos alo-T puede aumentar adicionalmente tales respuestas bloqueando la salida de linfocitos y concentrando la respuesta antitumoral en los ganglios linfáticos.

Tomados en conjunto, los resultados del presente estudio proporcionan una prueba de principio para la aplicación de la terapia adoptiva alogénica, que es tanto segura como eficaz en el modelo de ratón de los presentes inventores utilizando células T de repertorio abierto alogénico completamente incompatibles redirigidas por un CAR específico tumoral. La combinación de células T alogénicas no compatibles de MHC con un receptor de antígeno quimérico no restringido de MHC produce "células efectoras universales" que podrían usarse potencialmente como una terapia celular "off-the-shelf" (lista para su uso) para el cáncer. La inhibición de la egresión linfocitaria mejora la terapia adoptiva alogénica de tal forma que los cuerpos T alogénicos proporcionaron un mayor beneficio terapéutico que los cuerpos T singénicos a pesar de su limitada persistencia. Estos resultados sugieren que, con un ajuste adicional, la terapia adoptiva alogénica puede convertirse en el tratamiento de elección, tanto por sus obvias ventajas logísticas y económicas, como por su mayor eficacia.

#### Referencias citadas

- 1 Rosenberg, S.A., N.P. Restifo, J.C. Yang, R.A. Morgan, and M.E. Dudley, Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(4): p. 299-308.
- 2 Gattinoni, L., D.J. Powell, Jr., S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo, Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(5): p. 383-93.
- 3 Gattinoni, L., S.E. Finkelstein, C.A. Klebanoff, P.A. Antony, D.C. Palmer, P.J. Spiess, L.N. Hwang, Z. Yu, C. Wrzesinski, D.M. Heimann, C.D. Surh, S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo, Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med*, 2005. 202(7): p. 907-12.
- 4 Muranski, P., A. Boni, C. Wrzesinski, D.E. Citrin, S.A. Rosenberg, R. Childs, and N.P. Restifo, Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol*, 2006. 3(12): p. 668-81.
- 5 Sadelain, M., R. Brentjens, and I. Riviere, The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol*, 2009. 21(2): p. 215-23.
- 6 Varela-Rohena, A., C. Carpenito, E.E. Perez, M. Richardson, R.V. Parry, M. Milone, J. Scholler, X. Hao, A. Mexas, R.G. Carroll, C.H. June, and J.L. Riley, Genetic engineering of T cells for adoptive immunotherapy. *Immunol Res*, 2008. 42(1-3): p. 166-81.
- 7 Dudley, M.E., J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, R. Sherry, N.P. Restifo, A.M. Hubicki, M.R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C.A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, D.E. White, and S.A. Rosenberg, Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*, 2002. 298(5594): p. 850-4.
- 8 Friedmann-Morvinski, D., A. Bendavid, T. Waks, D. Schindler, and Z. Eshhar, Redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation. *Blood*, 2005. 105(8): p. 3087-93.
- 9 Eshhar, Z., T. Waks, G. Gross, and D.G. Schindler, Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(2): p. 720-4.
- 10 Dotti, G., B. Savoldo, and M. Brenner, Fifteen Years of Gene Therapy Based on Chimeric Antigen Receptors: "Are We Nearly There Yet?" *Hum Gene Ther*, 2009 20:1229-39.
- 11 June, C.H., Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest*, 2007. 117(6): p. 1466-76.
- 12 Pule, M.A., B. Savoldo, G.D. Myers, C. Rossig, H.V. Russell, G. Dotti, M.H. Huls, E. Liu, A.P. Gee, Z. Mei, E. Yvon, H.L. Weiss, H. Liu, C.M. Rooney, H.E. Heslop, and M.K. Brenner, Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med*, 2008. 14(11): p. 1264-70.
- 13 Copelan, E.A., Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 2006. 354(17): p. 1813-26.
- 14 Welniak, L.A., B.R. Blazar, and W.J. Murphy, Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol*, 2007. 25: p. 139-70.
- 15 Terasaki, P.I., Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant*, 2003. 3(6): p. 665-73.
- 16 Milland, J. and M.S. Sandrin, ABO blood group and related antigens, natural antibodies and transplantation. *Tissue Antigens*, 2006. 68(6): p. 459-66.

- 17 Karre, K., Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol*, 2008. 9(5): p. 477-80.
- 18 Beilhack, A., S. Schulz, J. Baker, G.F. Beilhack, R. Nishimura, E.M. Baker, G. Landan, E.I. Herman, E.C. Butcher, C.H. Contag, and R.S. Negrin, Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood*, 2008. 111(5): p. 2919-28.
- 5 19 Cyster, J.G., Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 127-59.
- 20 Klebanoff, C.A., L. Gattinoni, P. Torabi-Parizi, K. Kerstann, A.R. Cardones, S.E. Finkelstein, D.C. Palmer, P.A. Antony, S.T. Hwang, S.A. Rosenberg, T.A. Waldmann, and N.P. Restifo, Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(27): p. 9571-6.
- 10 21 Lanzavecchia, A. and F. Sallusto Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*, 2005. 17(3): p. 326-32.
- 22 Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 745-63.
- 15 23 Zheng, H., C. Matte-Martone, D. Jain, J. McNiff, and W.D. Shlomchik, Central memory CD8+ T cells induce graft-versus-host disease and mediate graft-versus-leukemia. *J Immunol*, 2009. 182(10): p. 5938-48.
- 24 Dazzi, F. and J.M. Goldman, Adoptive immunotherapy following allogeneic bone marrow transplantation. *Annu Rev Med*, 1998. 49: p. 329-40.
- 20 25 Tomblyn, M. and H.M. Lazarus, Donor lymphocyte infusions: the long and winding road: how should it be traveled? *Bone Marrow Transplant*, 2008. 42(9): p. 569-79.
- 26 Kolb, H.J., J. Mittermuller, C. Clemm, E. Holler, G. Ledderose, G. Brehm, M. Heim, and W. Wilmanns, Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*, 1990. 76(12): p. 2462-5.
- 25 27 Baker, J., M.R. Verneris, M. Ito, J.A. Shizuru, and R.S. Negrin, Expansion of cytolytic CD8(+) natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production. *Blood* : (10)97 .2001, p. 2923-31.
- 28 Nishimura, R., J. Baker, A. Beilhack, R. Zeiser, J.A. Olson, E.I. Sega, M. Karimi, and R.S. Negrin, In vivo trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity. *Blood*, 2008. 112(6): p. 2563-74.
- 30 29 Verneris, M.R., M. Karami, J. Baker, A. Jayaswal, and R.S. Negrin, Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood*, 2004. 103(8): p. 3065-72.
- 30 Boni, A., P. Muranski, L. Cassard, C. Wrzesinski, C.M. Paulos, D.C. Palmer, L. Gattinoni, C.S. Hinrichs, C.C. Chan, S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo, Adoptive transfer of allogeneic tumor-specific T cells mediates effective regression of large tumors across major histocompatibility barriers. *Blood*, 2008. 112(12): p. 4746-54.
- 35 31 Zakrzewski, J.L., D. Suh, J.C. Markley, O.M. Smith, C. King, G.L. Goldberg, R. Jenq, A.M. Holland, J. Grubin, J. Cabrera-Perez, R.J. Brentjens, S.X. Lu, G. Rizzuto, D.B. Sant'Angelo, I. Riviere, M. Sadelain, G. Heller, J.C. Zuniga-Pflucker, C. Lu, and M.R. van den Brink, Tumor immunotherapy across MHC barriers using allogeneic T-cell precursors. *Nat Biotechnol*, 2008. 26(4): p. 453-61.
- 40 32 Van Kaer, L., Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides. *Immunol Res*, 2001. 23(2-3): p. 205-14.
- 33 Sambrook, J.G. and S. Beck, Evolutionary vignettes of natural killer cell receptors. *Curr Opin Immunol*, 2007. 19(5): p. 553-60.
- 45 34 Lanier, L.L., Natural killer cells fertile with receptors for HLA-G? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(10): p. 5343-5.
- 35 Rudd, C.E. and H. Schneider, Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(7): p. 544-56.
- 36 Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M.L. Belladonna, R. Bianchi, M.C. Fioretti, and P. Puccetti, CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*, 2002. 3(11): p. 1097-101.
- 50 37 Taylor, P.A., C.J. Lees, S. Fournier, J.P. Allison, A.H. Sharpe, and B.R. Blazar, B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]. *J Immunol*, 2004. 172(1): p. 34-9.
- 38 Leung, H.T., J. Bradshaw, J.S. Cleaveland, and P.S. Linsley, Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high-avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem*, 1995. 270(42): p. 25107-14.
- 55 39 Lundqvist, A., J.P. McCoy, L. Samsel, and R. Childs, Reduction of GVHD and enhanced antitumor effects after adoptive infusion of alloreactive Ly49-mismatched NK cells from MHC-matched donors. *Blood*, 2007. 109(8): p. 3603-6.
- 60 40 Cao, Y.A., A.J. Wagers, A. Beilhack, J. Dusich, M.H. Bachmann, R.S. Negrin, I.L. Weissman, and C.H. Contag, Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(1): p. 221-6.
- 41 Matloubian, M., C.G. Lo, G. Cinamon, M.J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M.L. Allende, R.L. Proia, and J.G. Cyster, Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, 2004. 427(6972): p. 355-60.

- 42 Hashimoto, D., S. Asakura, K. Matsuoka, Y. Sakoda, M. Koyama, K. Aoyama, M. Tanimoto, and T. Teshima, FTY720 enhances the activation-induced apoptosis of donor T cells and modulates graft-versus-host disease. *Eur J Immunol*, 2007. 37(1): p. 271-81.
- 5 43 Taylor, P.A., M.J. Ehrhardt, C.J. Lees, J. Tolar, B.J. Weigel, A. Panoskaltsis-Mortari, J.S. Serody, V. Brinkmann, and B.R. Blazar, Insights into the mechanism of FTY720 and compatibility with regulatory T cells for the inhibition of graft-versus-host disease (GVHD). *Blood*, 2007. 110(9): p. 3480-8.
- 44 Kustikova, O., B. Fehse, U. Modlich, M. Yang, J. Dullmann, K. Kamino, N. von Neuhoff, B. Schlegelberger, Z. Li, and C. Baum, Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science*, 2005. 308(5725): p. 1171-4.
- 10 45 Kustikova, O.S., U. Modlich, and B. Fehse, Retroviral insertion site analysis in dominant haematopoietic clones. *Methods Mol Biol*, 2009. 506: p. 373-90.
- 46 Modlich, U., O.S. Kustikova, M. Schmidt, C. Rudolph, J. Meyer, Z. Li, K. Kamino, N. von Neuhoff, B. Schlegelberger, K. Kuehlicke, K.D. Bunting, S. Schmidt, A. Deichmann, C. von Kalle, B. Fehse, and C. Baum, Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4235-46.
- 15 47 Robbins, P.F., M.E. Dudley, J. Wunderlich, M. El-Gamil, Y.F. Li, J. Zhou, J. Huang, D.J. Powell, Jr., and S.A. Rosenberg, Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol*, 2004. 173(12): p. 7125-30.
- 48 Zhou, J., M.E. Dudley, S.A. Rosenberg, and P.F. Robbins, Persistence of multiple tumor-specific T-cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy. *J Immunother*, 2005. 28(1): p. 53-62.
- 49 Gattinoni, L., C.A. Klebanoff, D.C. Palmer, C. Wrzesinski, K. Kerstann, Z. Yu, S.E. Finkelstein, M.R. Theoret, S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo, Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest*, 2005. 115(6): p. 1616-26.
- 25 50 Blum, K.S. and R. Pabst, Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs? *Immunol Lett*, 2007. 108(1): p. 45-51.
- 51 Ganusov, V.V. and R.J. De Boer, Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol*, 2007. 28(12): p. 514-8.
- 52 Porter, D.L., B.L. Levine, N. Bunin, E.A. Stadtmauer, S.M. Luger, S. Goldstein, A. Loren, J. Phillips, S. Nasta, A. Perl, S. Schuster, D. Tsai, A. Sohal, E. Veloso, S. Emerson, and C.H. June, A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation. *Blood*, 2006. 107(4): p. 1325-31.
- 30 53 Rapoport, A.P., B.L. Levine, A. Badros, B. Meisenberg, K. Ruehle, A. Nandi, S. Rollins, S. Natt, B. Ratterree, S. Westphal, D. Mann, and C.H. June, Molecular remission of CML after autotransplantation followed by adoptive transfer of costimulated autologous T cells. *Bone Marrow Transplant*, 2004. 33(1): p. 53-60.
- 35 54 Gattinoni, L., X.S. Zhong, D.C. Palmer, Y. Ji, C.S. Hinrichs, Z. Yu, C. Wrzesinski, A. Boni, L. Cassard, L.M. Garvin, C.M. Paulos, P. Muranski, and N.P. Restifo, Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med*, 2009. 15(7): p. 80813.-
- 55 Bondanza, A., V. Valtolina, Z. Magnani, M. Ponzoni, K. Fleischhauer, M. Bonyhadi, C. Traversari, F. Sanvito, S. Toma, M. Radrizzani, S. La Seta-Catamancio, F. Ciceri, C. Bordignon, and C. Bonini, Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. *Blood*, 2006. 107(5): p. 1828-36.
- 56 Arditti, F.D., S. Aviner, B. Dekel, R. Krauthgamer, J. Gan, A. Nagler, A. Tabilio, M. Martelli, A. Berrebi, and Y. Reisner, Eradication of B-CLL by autologous and allogeneic host nonreactive anti-third-party CTLs. *Blood*, 2005. 105(8): p. 3365-71.
- 45 57 Aviner, S., X. Yao, R. Krauthgamer, Y. Gan, R. Goren-Arbel, T. Klein, A. Tabilio, J.D. McMannis, R. Champlin, M.F. Martelli, E. Bachar-Lustig, and Y. Reisner, Large-scale preparation of human anti-third-party veto cytotoxic T lymphocytes depleted of graft-versus-host reactivity: a new source for graft facilitating cells in bone marrow transplantation. *Hum Immunol*, 2005. 66(6): p. 644-52.
- 50 58 Tran, K.Q., J. Zhou, K.H. Durflinger, M.M. Langan, T.E. Shelton, J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, S.A. Rosenberg, and M.E. Dudley, Minimally cultured tumor-infiltrating lymphocytes display optimal characteristics for adoptive cell therapy. *J Immunother*, 2008. 31(8): p. 742-51.
- 59 Chen, B.J., D. Deoliveira, X. Cui, N.T. Le, J. Son, J.F. Whitesides, and N.J. Chao, Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse. *Blood*, 2007. 109(7): p. 3115-23.
- 60 60 Kim, Y.M., T. Sachs, W. Asavaroengchai, R. Bronson, and M. Sykes, Graft-versus-host disease can be separated from graft-versus-lymphoma effects by control of lymphocyte trafficking with FTY720. *J Clin Invest*, 2003. 111(5): p. 659-69.
- 61 Eshhar, Z. The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity. *Handb Exp Pharmacol*, 329-42 (2008).
- 62 Stephan, M.T. et al. T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nat Med* 13, 1440-9 (2007).
- 63 Qiao, J. et al. Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy. *Nat Med* 14, 37-44 (2008).
- 64 Haque, T. et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 110, 1123-31 (2007).

65 Leen, A.M. et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 114, 4283-92 (2009).

5 66 Melenhorst, J.J. et al. Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood* 116, 4700-2.

67 Amir, A.L. et al. Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood* 115, 3146-57.

68 Gaston, J.S., Rickinson, A.B. & Epstein, M.A. Cross-reactivity of self-HLA-restricted Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes for allo-HLA determinants. *J Exp Med* 158, 1804-21 (1983).

10 69 Kaneko, S. et al. IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene-modified alloreactive self-renewing central memory human T lymphocytes. *Blood* 113, 1006-15 (2009).

70 Edinger, M. et al. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia* 1, 303-10 (1999).

15 71 Pinthus, J.H. et al. Adoptive immunotherapy of prostate cancer bone lesions using redirected effector lymphocytes. *J Clin Invest* 114, 1774-81 (2004).

20

## REIVINDICACIONES

1. Una cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente que ha sido sometido a linfodepleción parcial, en donde dicha linfodepleción parcial se da en un grado suficiente para retrasar la reacción del huésped frente al injerto durante un período suficiente para permitir que dicha cantidad efectiva de células T alogénicas ataque al tumor al que están dirigidas, pero en un grado insuficiente como para requerir el rescate del sistema inmune del huésped mediante trasplante de médula ósea.
2. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde a dicho paciente se le administra adicionalmente uno o más agentes que retrasan la egressión de las células T alogénicas de los ganglios linfáticos de dicho paciente. después de la transferencia adoptiva de dichas células T alogénicas al sujeto, atrapando las células T en los ganglios linfáticos.
3. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el agente que atrapa las células T en el ganglio linfático se selecciona del grupo que consiste en 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol (FTY720), 5-[4-fenil-5-(trifluorometil)tiofen-2-il]-3-[3-(trifluorometil)fenil] 1,2,4-oxadiazol (SEW2871), ácido 3-(2-((hexilfenilamino)-2-oxoetilamino)propanoico (W123) y 2-amonio-4-(2-cloro-4-(3-fenoxifeniltio)fenil)-2-(hidroximetil) butil hidrógeno fosfato (KRP-203 fosfato).
4. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el receptor quimérico dirigido al tumor está basado en anticuerpos.
5. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el reconocimiento y la eliminación de las células T alogénicas *in vivo* por las células T del receptor se inhiben silenciando la expresión de MHC por parte de las células T alogénicas, de modo que se reduce el rechazo de las células alogénicas.
6. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde las células T alogénicas se han cultivado con un shRNA o un nucleótido antisentido que elimina la expresión de MHC, silenciando la expresión de MHC.
7. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en donde dichas células T alogénicas se han modificado adicionalmente para expresar un ligando inhibidor para células NK, inhibiendo así el reconocimiento y la eliminación de las células T alogénicas *in vivo* por parte de las células T del receptor con el fin de reducir el rechazo de las células alogénicas.
8. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en donde la linfodepleción parcial se logra mediante tratamiento de radiación, quimioterapia y/o depleción por anticuerpos.
9. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la linfodepleción parcial comprende la radiación corporal total del paciente.
10. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la linfodepleción parcial comprende administrar una cantidad efectiva de un agente quimioterapéutico depletante de linfocitos.
11. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el agente quimioterapéutico linfodeplejante es ciclofosfamida, fludarabina, busulfán, melfalán o anticuerpos depletantes de linfocitos.
12. La cantidad eficaz de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11, en donde las células T alogénicas se activan y opcionalmente se expanden antes de su uso en el tratamiento.
13. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde las células T alogénicas se activan

*in vitro* con anticuerpos CD3/CD28 y las células T alogénicas se expanden adicionalmente con IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21.

5 14. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13, en donde la cantidad de células T alogénicas es suficiente para devolver la población de linfocitos linfodeplecionados a su cantidad homeostática.

10 15. La cantidad efectiva de células T alogénicas que expresan un receptor quimérico dirigido al tumor no restringido por el MHC para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14, en donde el uso comprende la administración en una o más dosis.

15

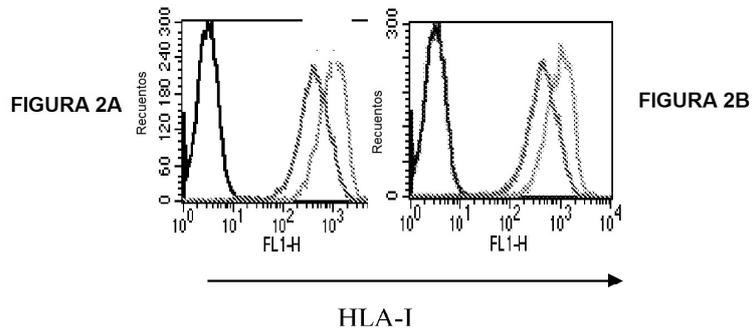
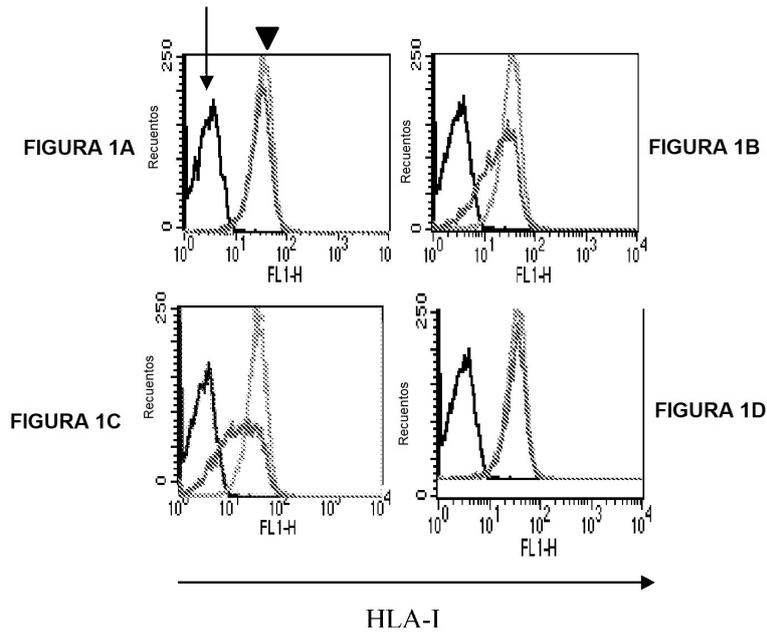


FIGURA 3A

|                    |                                                |        |
|--------------------|------------------------------------------------|--------|
| β2 -Microglobulina | Espaciador (Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>3</sub> | HLA-G1 |
|--------------------|------------------------------------------------|--------|

FIGURA 3B

|                                                   |                        |
|---------------------------------------------------|------------------------|
| Residuos 1-126 de la región extracelular de CTLA4 | Secuencia de señal GPI |
|---------------------------------------------------|------------------------|

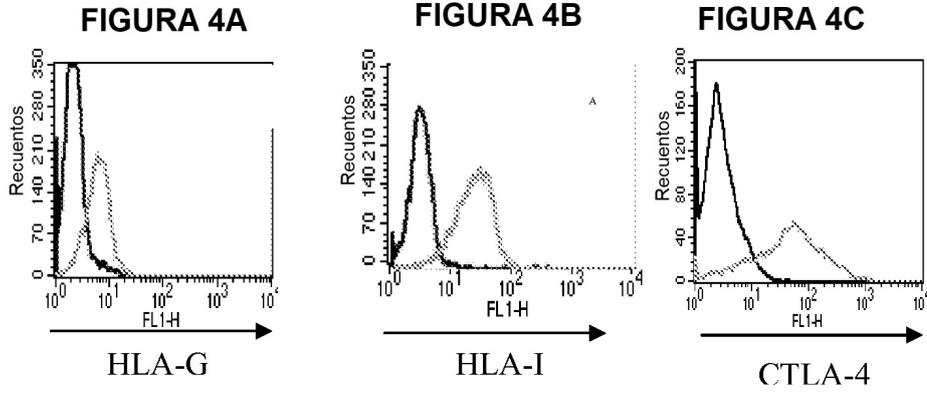


FIGURA 5A

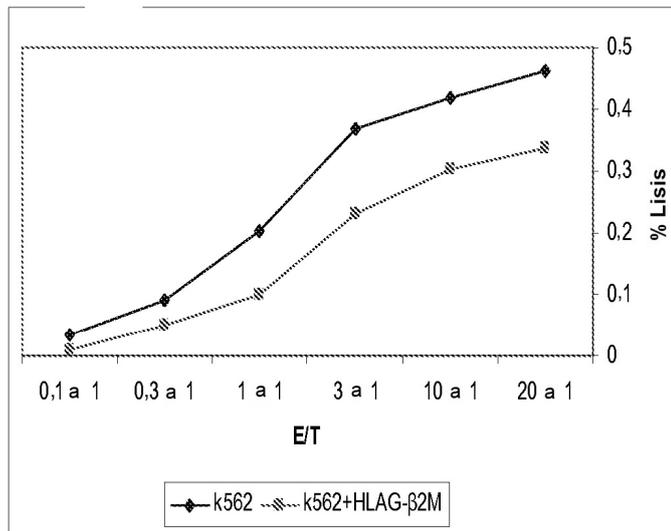


FIGURA 5B

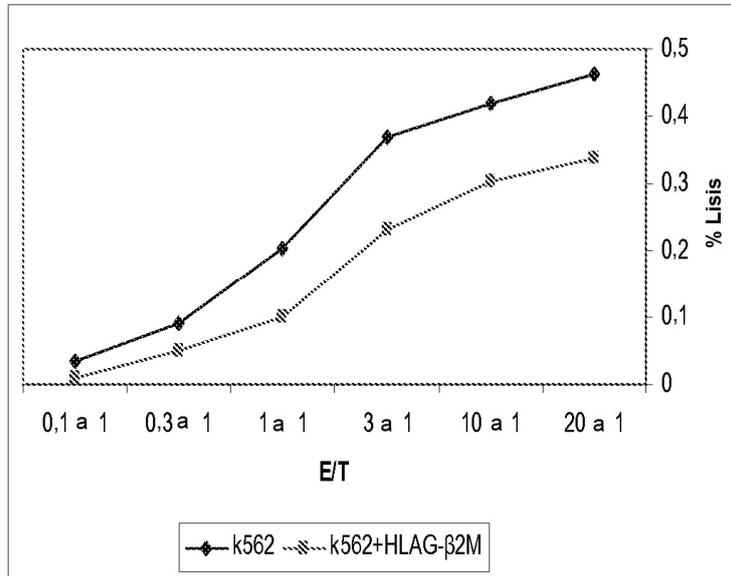
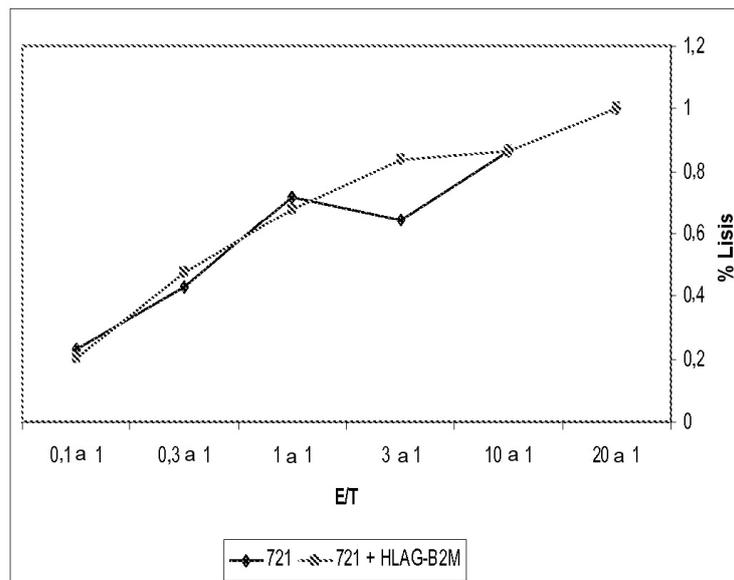
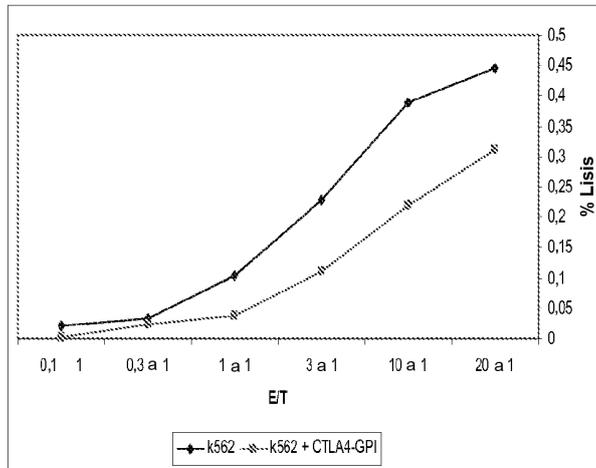


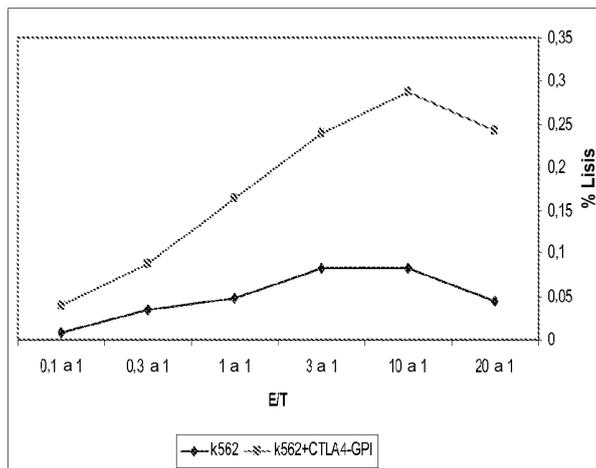
FIGURA 5C



**FIGURA 5D**



**FIGURA 5E**



**FIGURA 5F**

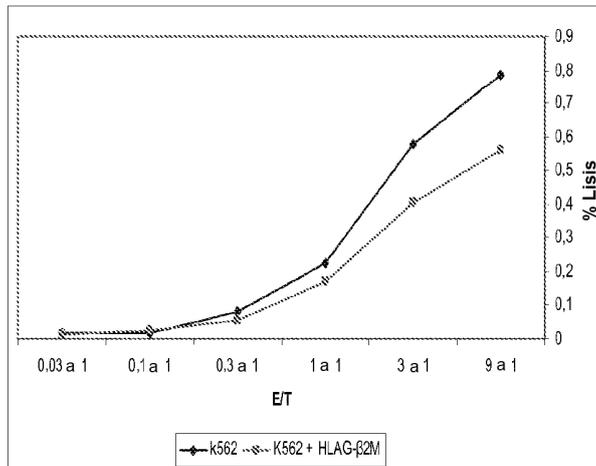


FIGURA 6A

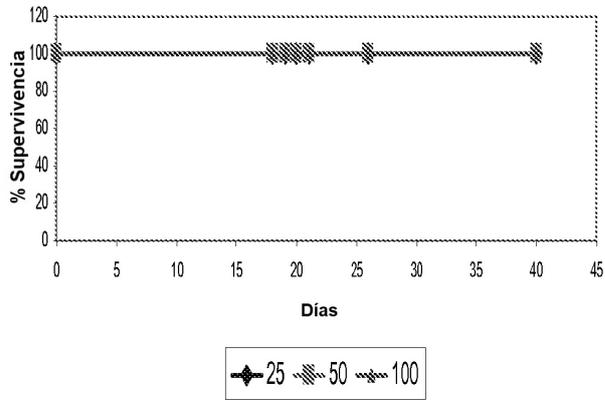


FIGURA 6B

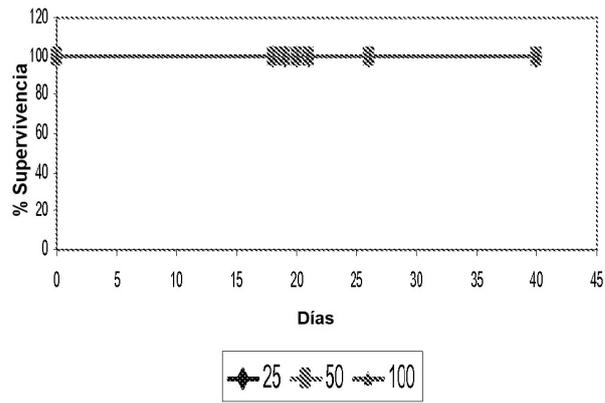


FIGURA 6C

400 Rads

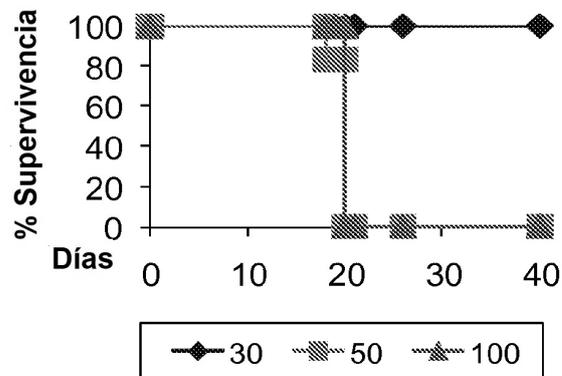


FIGURA 6D

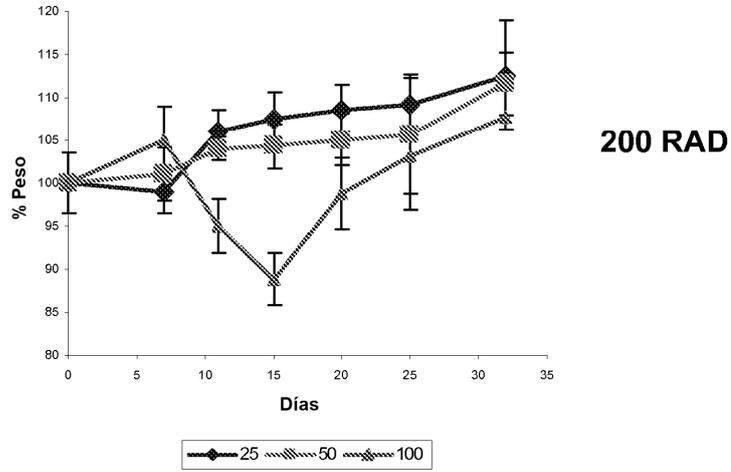


FIGURA 7A

Anti-HER2  
Basado en el anticuerpo N29

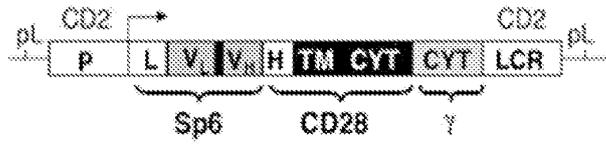


FIGURA 7B

Anti-HER2

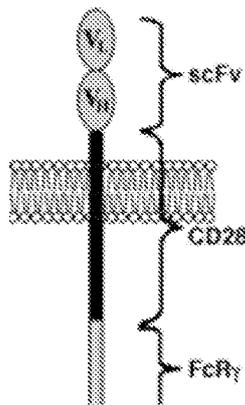


FIGURA 7C

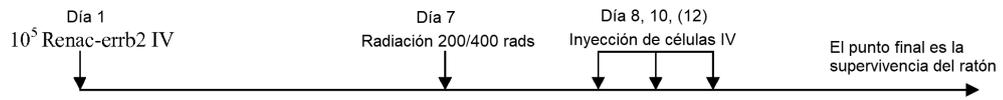


FIGURA 7D

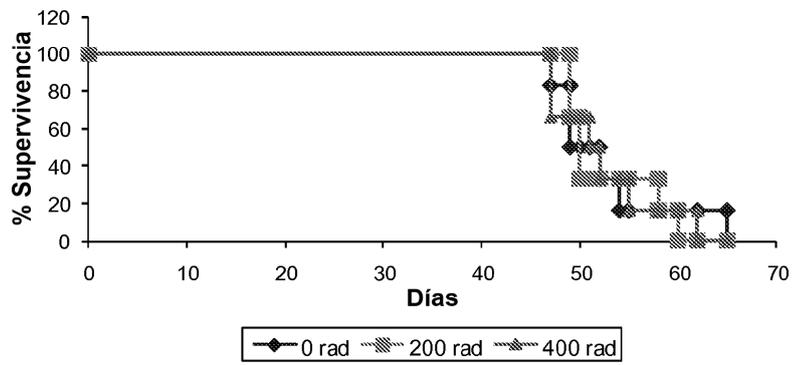


FIGURA 7E

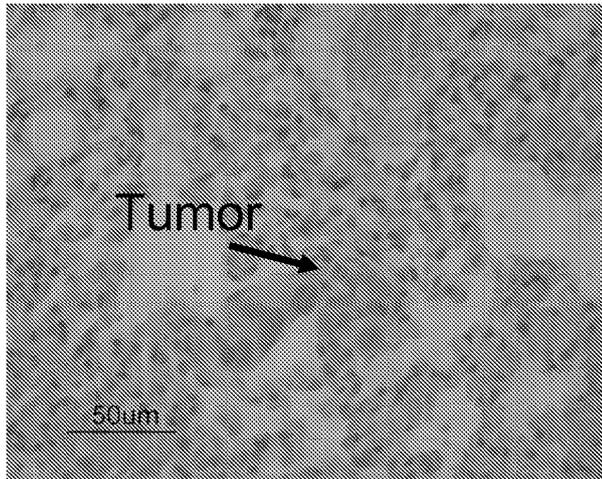


FIGURA 8A

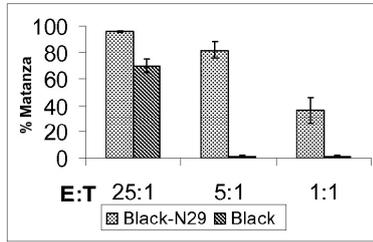


FIGURA 8B

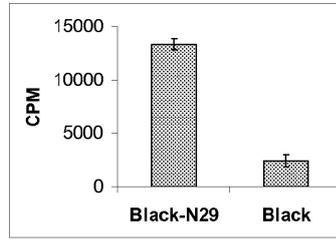


FIGURA 9

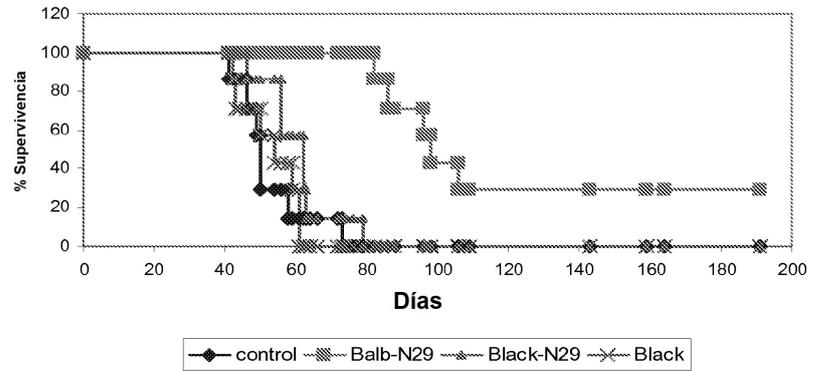


FIGURA 10A

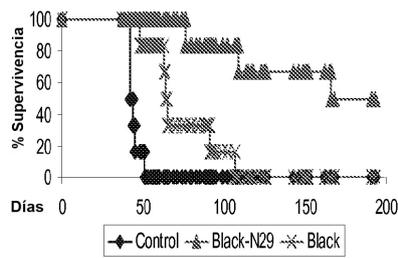


FIGURA 10B

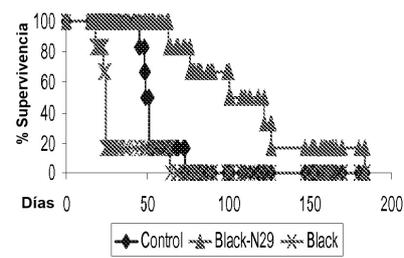


FIGURA 11A

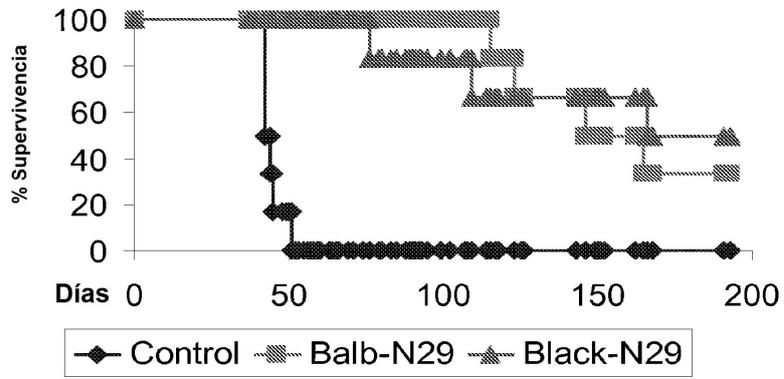


FIGURA 11B

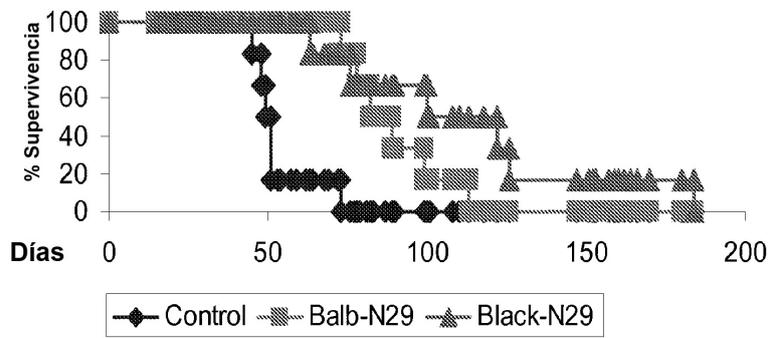


FIGURA 11C

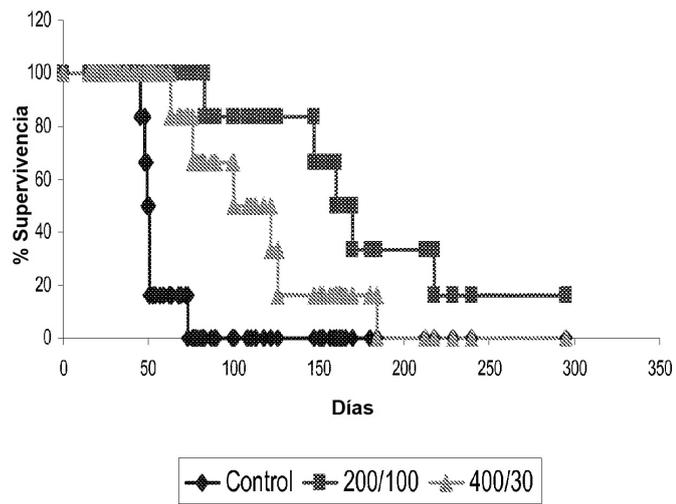




FIGURA 13A

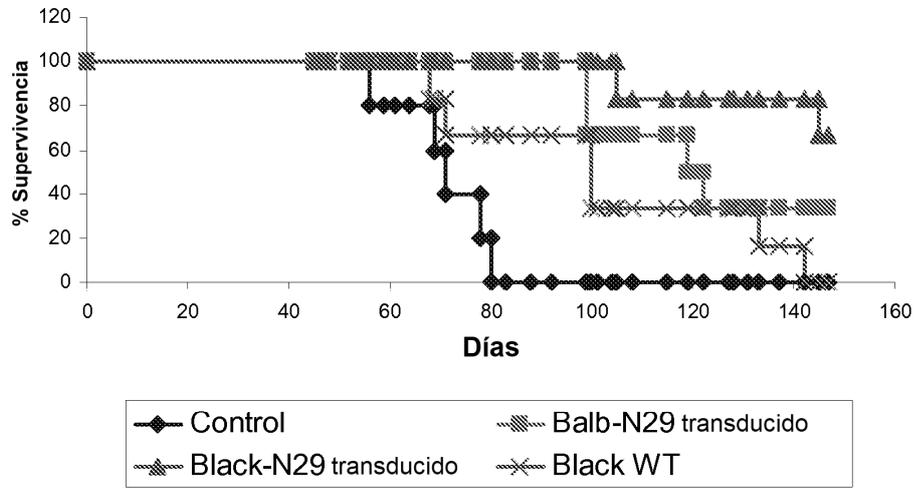


FIGURA 13B

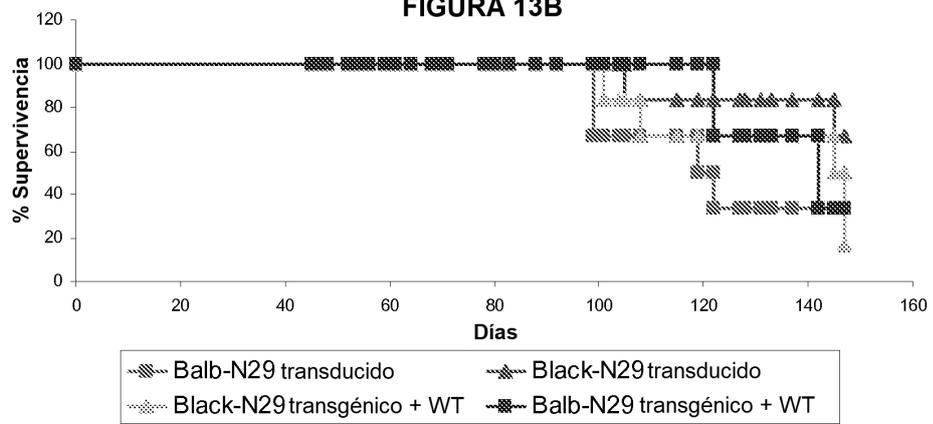


FIGURA 14

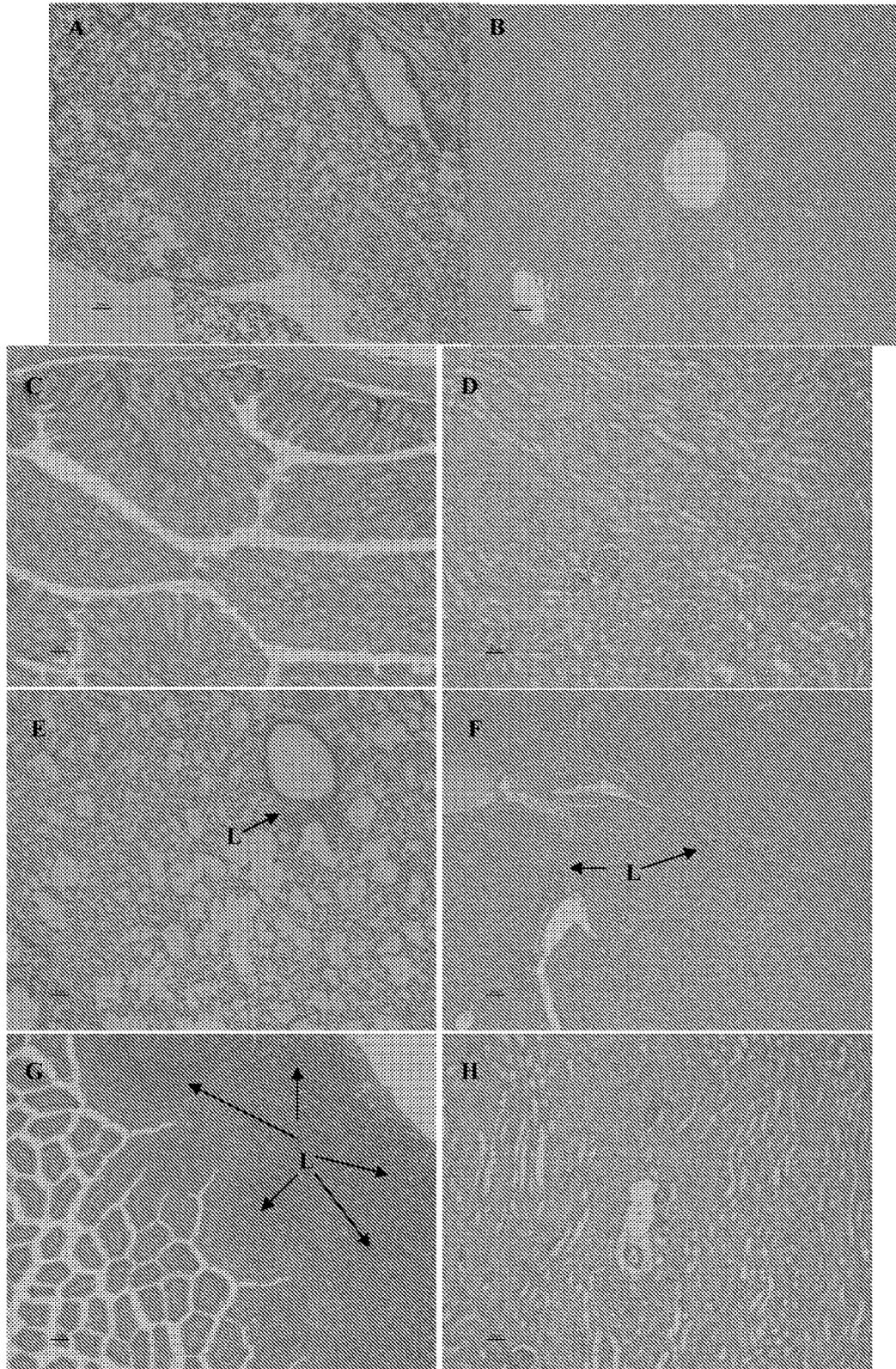
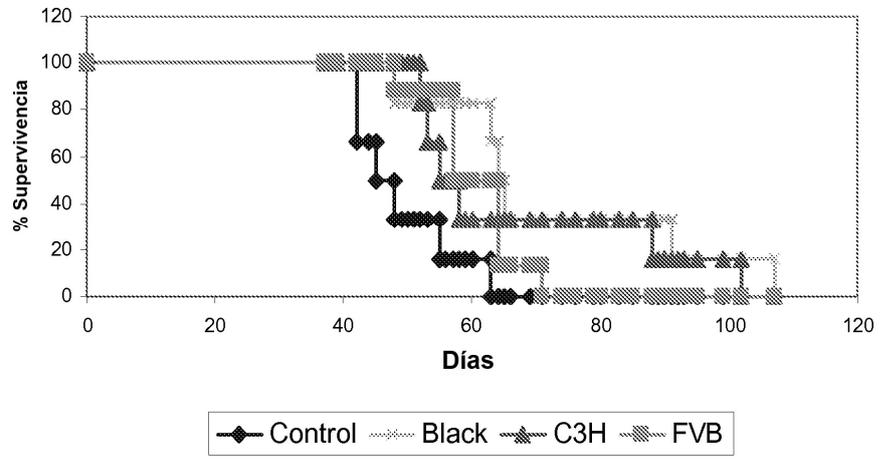


FIGURA 15



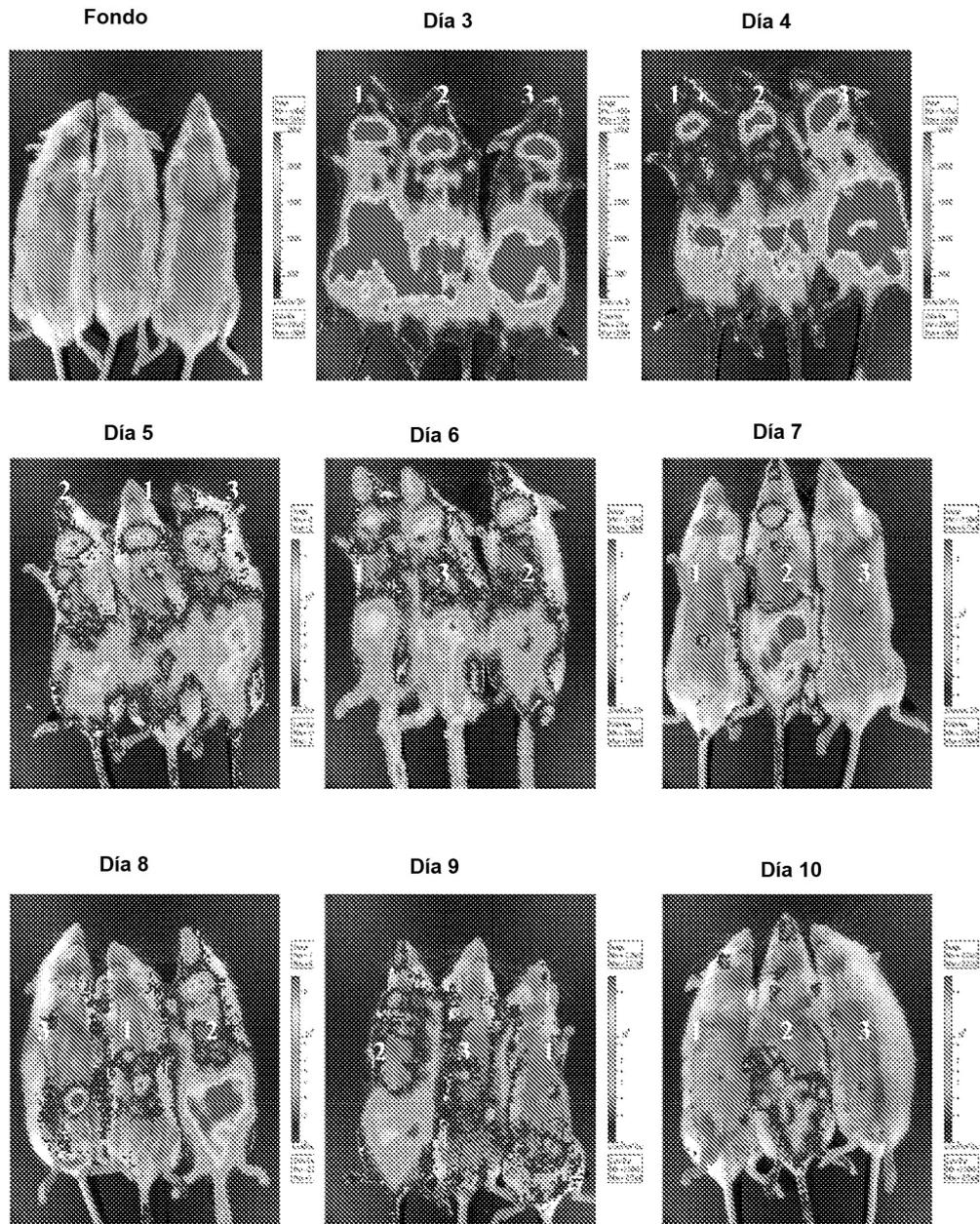


FIGURA 16

FIGURA 17A

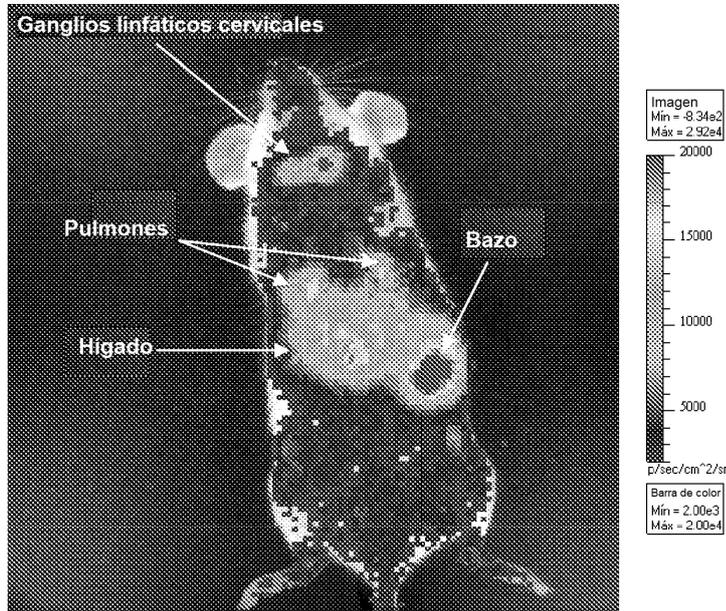


FIGURA 17B

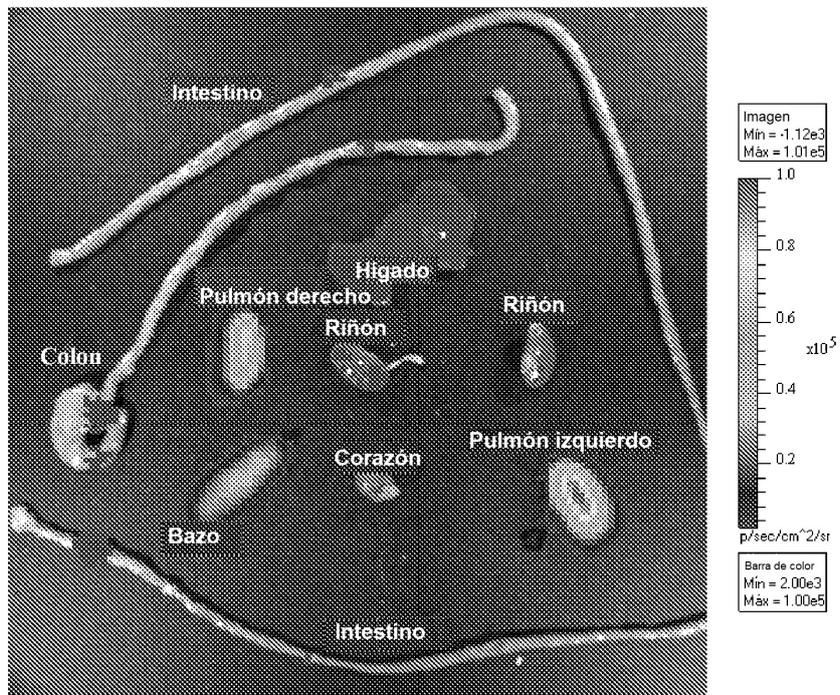


FIGURA 17C

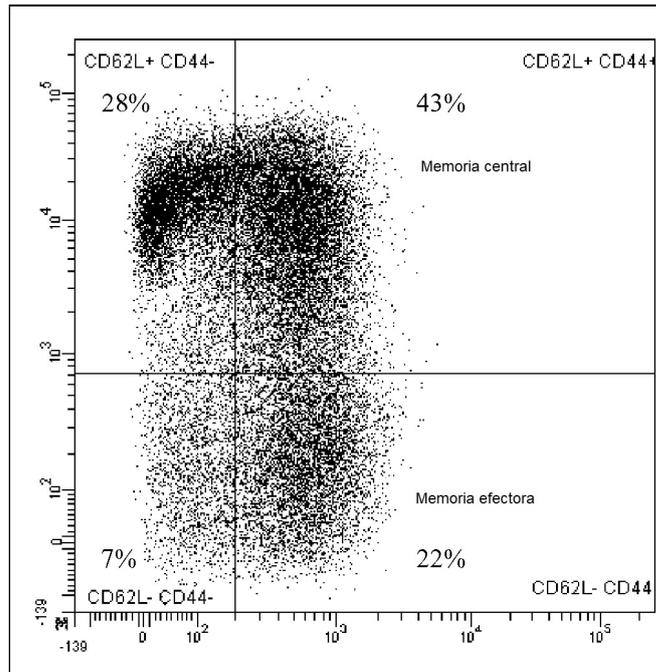


FIGURA 18A

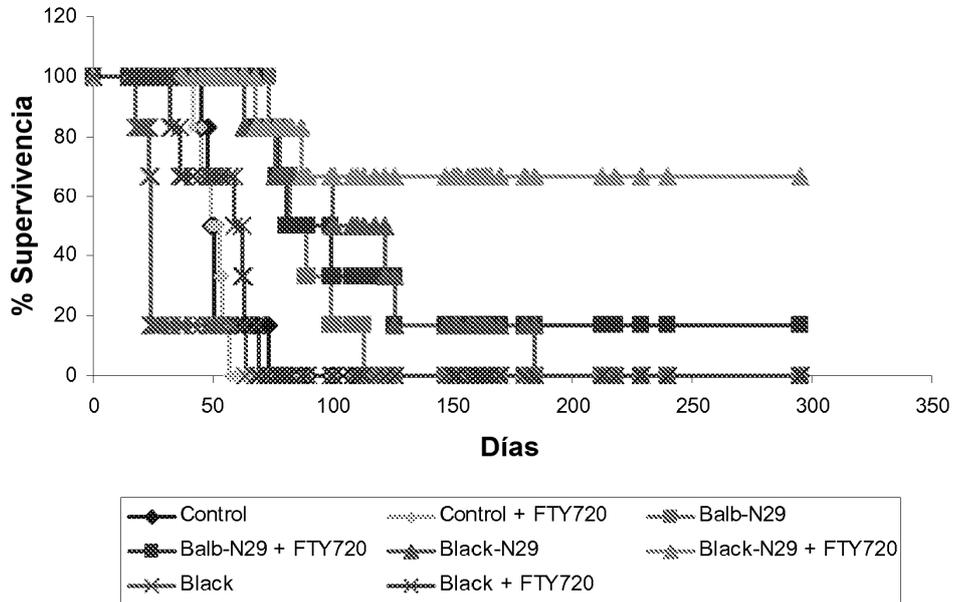


FIGURA 18B

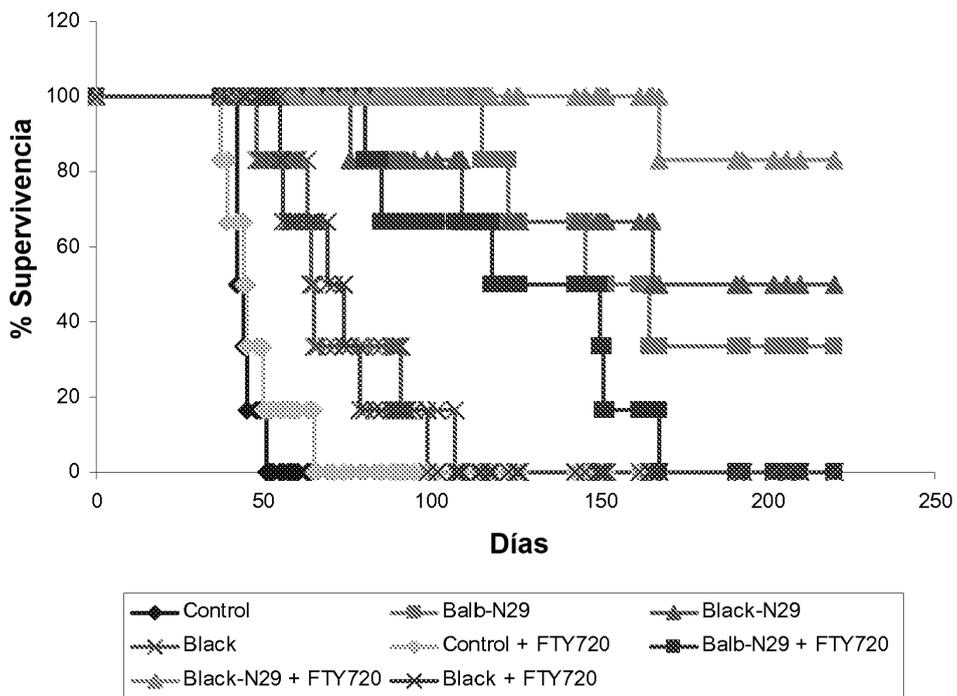


FIGURA 19A

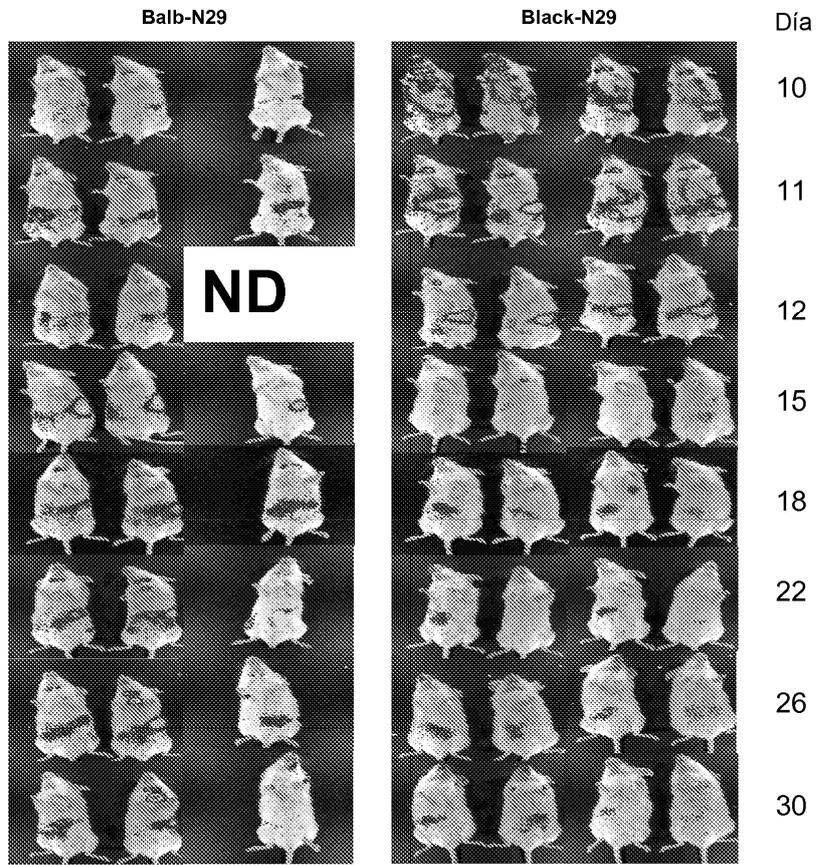


FIGURA 19B

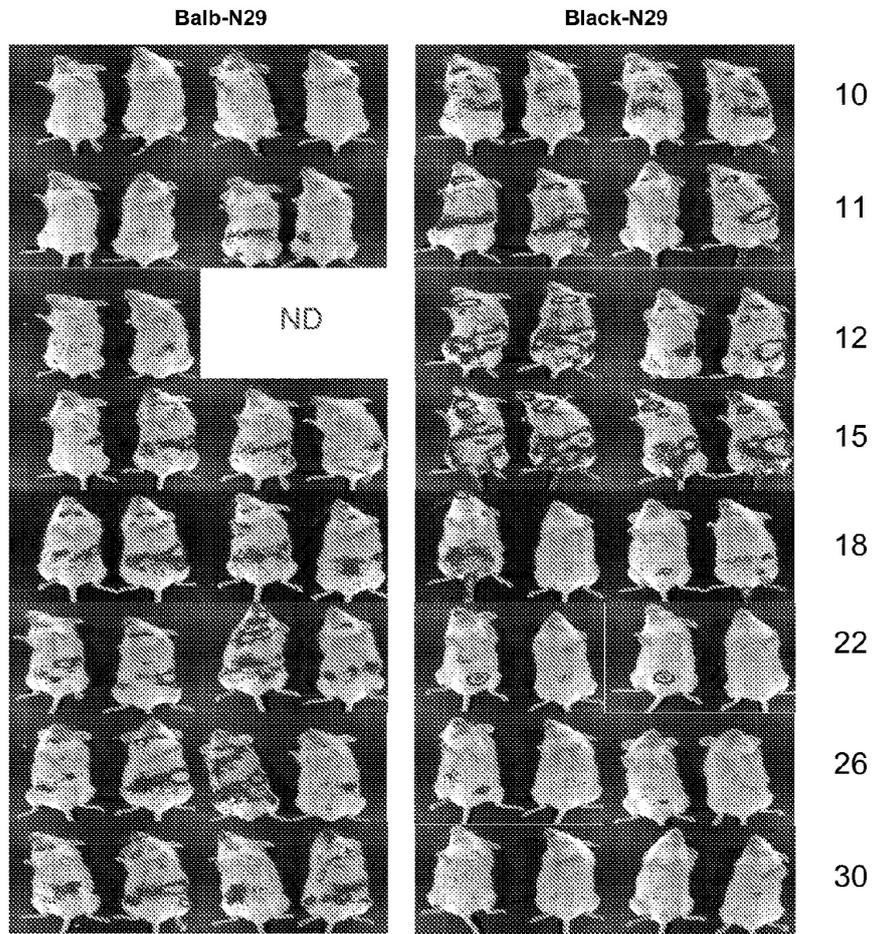


FIGURA 19C

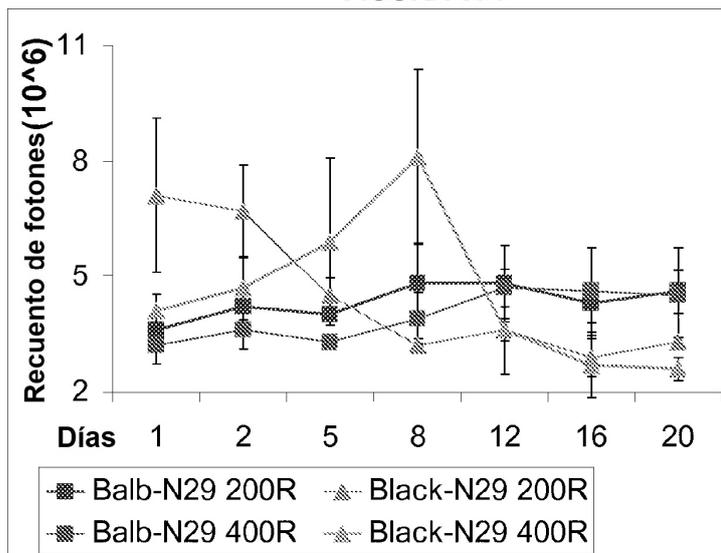


FIGURA 20A

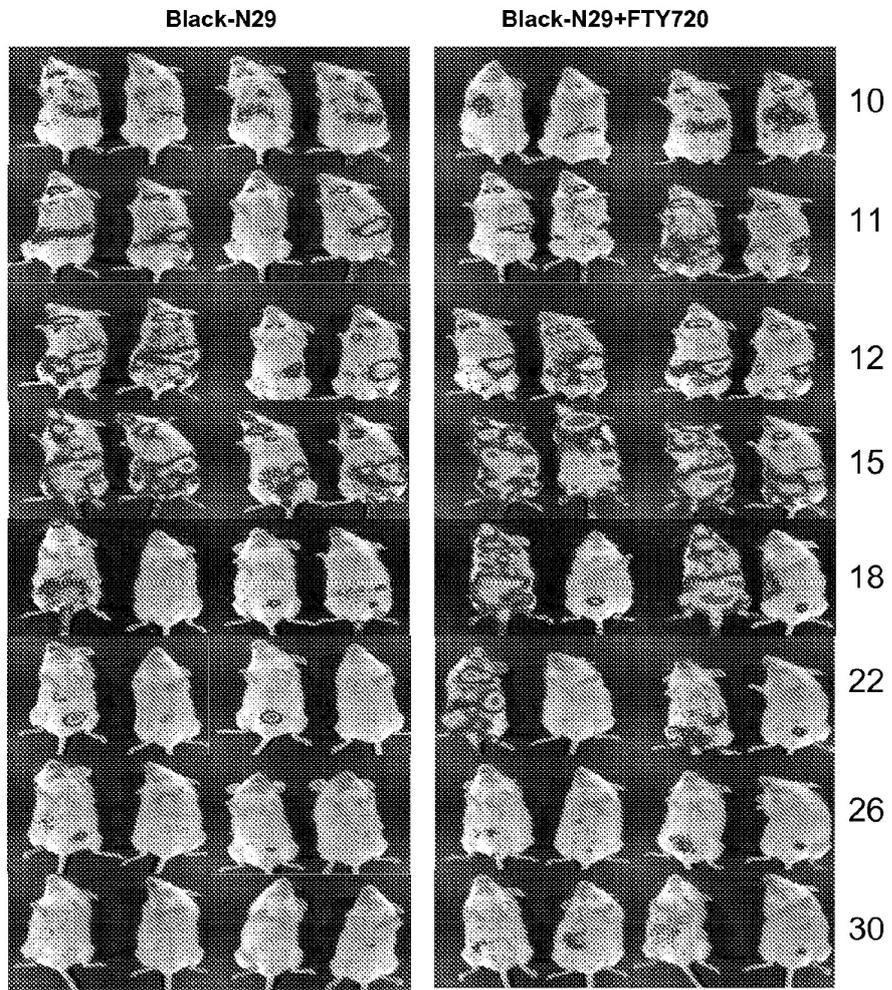


FIGURA 20B

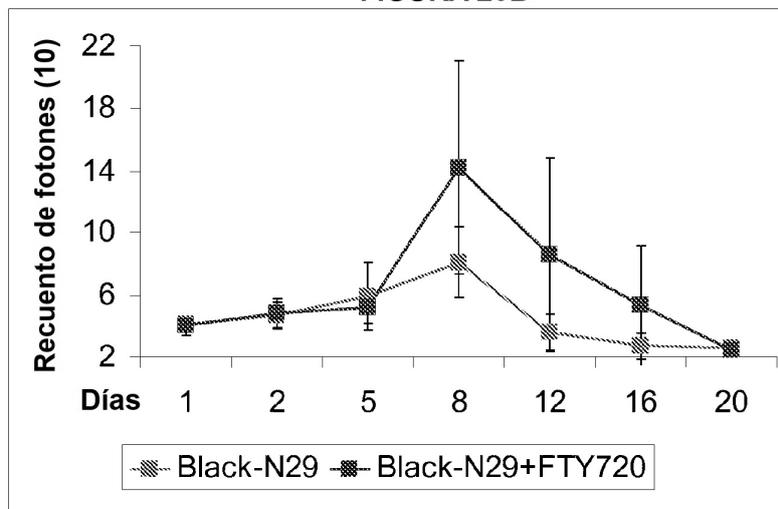


FIGURA 21

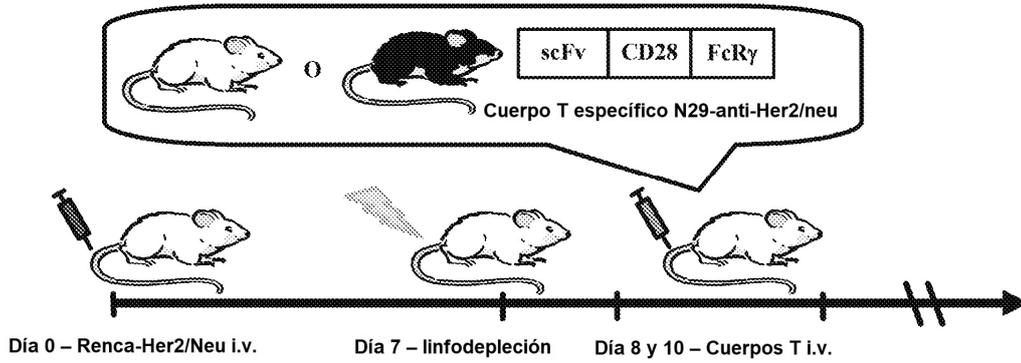


FIGURA 22

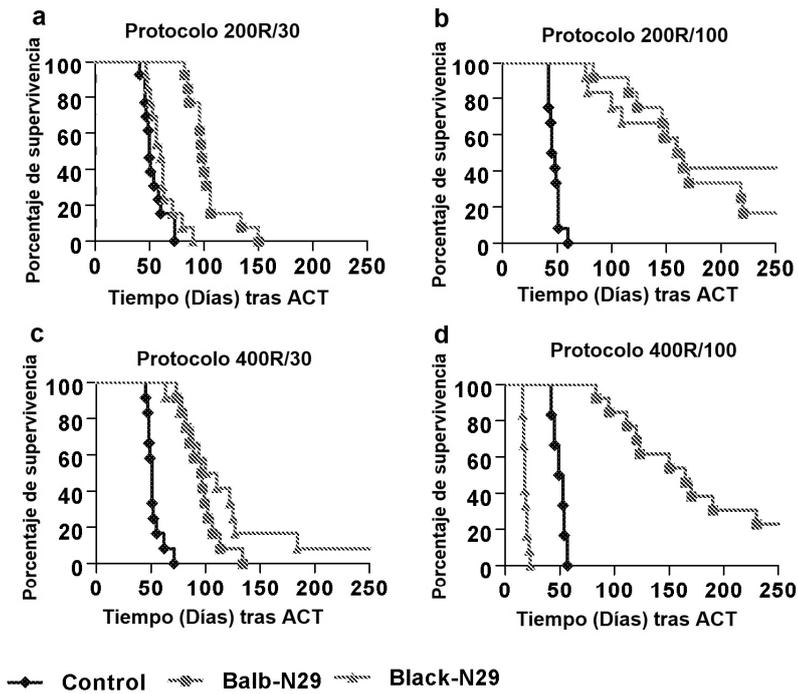


FIGURA 23

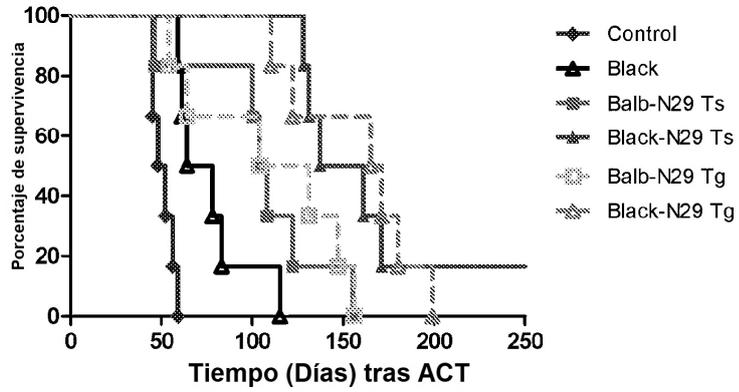


FIGURA 24

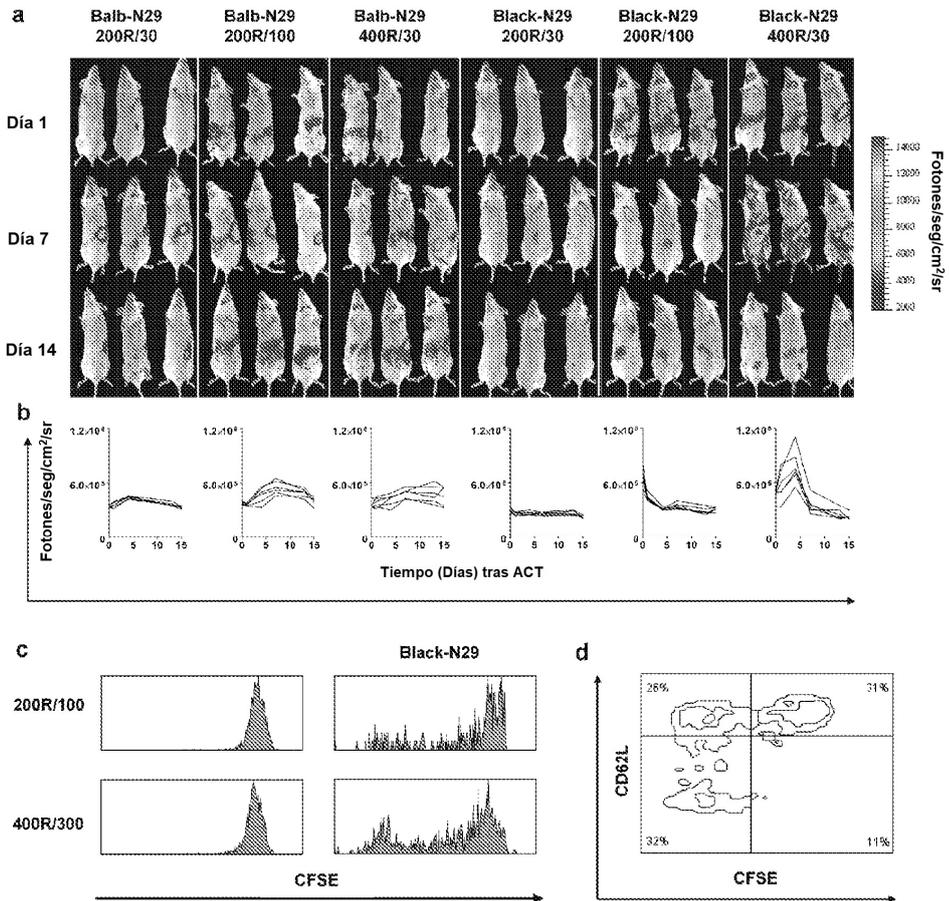


FIGURA 25

