

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 298**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012** **PCT/US2012/055443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013** **WO13040371**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012** **E 12831178 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018** **EP 2755487**

54 Título: **El microentorno tumoral como diana mediante el uso de células NKT manipuladas**

30 Prioridad:

16.09.2011 US 201161535719 P

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

11.06.2019

73 Titular/es:

BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (100.0%)
One Baylor Plaza
Houston, TX 77030, US

72 Inventor/es:

METELITSA, LEONID, S.;
LIU, DAOFENG;
DOTTI, GIANPIETRO y
HECZEY, ANDRAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 298 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

El microentorno tumoral como diana mediante el uso de células NKT manipuladas

Campo técnico

El campo de la presente invención incluye al menos biología, biología celular, inmunoterapia, y medicina.

5 Antecedentes de la invención

Las células NKT con Vα24 invariable (NKT) son un sublinaje conservado evolutivamente de células T que se caracterizan por la expresión de una cadena α de TCR invariable, Vα24-Jα18 y reactividad frente a glicolípidos propios y derivados de microbios presentados por la molécula CD1 d semejante a la clase I de HLA monomórfico (Kronenberg y Gapin, 2001). El potencial antitumoral de los NKT se ha demostrado en numerosos modelos tumorales (Swann *et al.*, 2004; Swann *et al.*, m 2007; Berzofsky y Terabe, 2009). La disminución selectiva del número de células NKT y/o de su actividad funcional se ha reportado en pacientes con diversos tipos de cáncer (Yanagisawa *et al.*, 2002; Tahir *et al.*, 2001; Dhodapkar *et al.*, 2003), sugiriendo que los NKT pueden jugar un papel importante en las respuestas inmunes antitumorales y, a la inversa, que un escape de los NKT puede contribuir a la progresión tumoral. Los NKT se infiltran en tumores primarios humanos en un subconjunto de niños con neuroblastoma (NB) y la infiltración de las células NKT está asociada con una mejoría a largo plazo de la supervivencia sin enfermedad (Metelitsa *et al.*, 2004). La infiltración de células NKT en tumores primarios también sirvió como un factor de pronóstico de resultado favorable en pacientes con cánceres colorrectales (Tachibana *et al.*, 2005), mientras bajos niveles de NKT circulantes fueron predictivos de un mal resultado clínico en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Moiling *et al.*, 2007).

La mayoría de los tumores sólidos son negativos para CD1 d, de manera que las células tumorales no pueden ser una diana directa para la citotoxicidad de las células NKT (Swann *et al.*, 2007; Metelitsa *et al.*, 2001). En lugar de esto, los monocitos/macrófagos asociados a tumor (TAM) son las únicas células en tumores de NB primarios que tienen una expresión de CD1 d detectable (Song *et al.*, 2009). Además, después del reconocimiento de los glicolípidos derivados de tumor, los NKT producen IFNγ y matan a las células monocíticas de una manera dependiente de CD1d. Como los TAM proporcionan un soporte estromal crítico para el crecimiento de las células tumorales en NB y muchos otros tipos de cáncer (Mantovani *et al.*, 2008; Sica *et al.*, 2008; Sica *et al.*, 2007), la muerte o la inhibición de TAM mediada por las células NKT explica cómo los NKT pueden impedir indirectamente el crecimiento tumoral. Otros reportes recientes han generado evidencia adicional sobre la importancia de las interacciones de las células NKT con las células monocíticas y otras células mieloides en la inmunidad viral y tumoral (De Santo *et al.*, 2008; De *et al.*, 2010) y en el mecanismo potencial de actividad antitumoral del ligando de células NKT, β-Manosilceramida (O'Konek *et al.*, 2011). Leonid S. Metelitsa, Clin Immunol. 2011 agosto; 140(2): 119-129 discute el potencial antitumoral de las células NKT de Tipo I frente a tumores positivos para CD1d y negativos para Cd1d en los seres humanos.

Los monocitos y otros precursores mielomonocíticos inmaduros de TAM se localizan en el sitio tumoral en respuesta a CCL2, la misma quimioquina que atrae a los NKT (Metelitsa *et al.*, 2004). Las células monocíticas, sin embargo, responden a otras múltiples señales quimiotácticas derivadas de tumor que no son reconocidas por los NKT u otras células T (Allavena *et al.*, 2008). La mayoría de estos factores (VEGF, endotelina, angiopoyetina-2) se producen en condiciones hipóxicas y dirigen la migración de los TAM hacia las áreas hipóxicas (Mantovani *et al.*, 2008; Allavena *et al.*, 2008; Mantovani *et al.*, 2006). De forma importante, la señalización hipóxica amplifica la activación de NF-κB en los TAM dando lugar a altos niveles de producción de IL6 y activación sostenida de STAT3 en células tumorales que, a su vez, estimula las respuestas inflamatorias en los TAM, proporcionando un bucle de retroalimentación positiva que juega un papel esencial en la progresión tumoral (Grivennikov *et al.*, 2010).

Aunque los NKT se colocan con los TAM productores de IL-6 en tejidos de NB primario (Song *et al.*, 2009), el mecanismo de esta colocación no se entiende, ni está claro cómo los TAM evaden las actividades inhibitoras de los NKT. Una comprensión de la interacción NKT-TAM en el contexto del microentorno tumoral es útil para el desarrollo de inmunoterapia frente al cáncer racional dirigida al estroma que soporta el tumor dado que los NKT son las únicas células efectoras inmunes conocidas que reconocen específicamente y regulan negativamente los TAM. Como se describe en la presente memoria, la localización de las células NKT en NB depende no solo de CCL2 derivado de tumor, sino también de CCL20, que se produce por los TAM en respuesta a inflamación e hipoxia inducidas por el tumor, que, a su vez, inhibe la viabilidad y función de las células NKT. También como se muestra en la presente memoria, IL-15 protege a los NKT frente a la hipoxia y la expresión transgénica de IL-15 en NKT aumenta fuertemente su eficacia antitumoral en un modelo de NB metastásico en ratones humanizados NOD/SCID/IL2rgamma(null) (hu-NSG).

Células T asesinas naturales (NKT) con Vα24 invariable en inmunidad e inmunoterapia tumoral. Como se ha indicado anteriormente, los NKT son un sublinaje conservado evolutivamente de células T que se caracterizan por reactividad frente a glicolípidos propios y derivados de microbios presentados por la molécula CD1d semejante a la clase I de HLA monomórfico. Expresan una cadena α de TCR invariable, Vα14-Jα18, que está emparejada preferentemente con Vβ11 (Porcelli *et al.*, 1993; Lantz y Bendelac, 1994; Bendelac *et al.*, 1995). Los NKT son linfocitos de vida larga que se desarrollan en el timo y están presentes incluso en neonatos como células funcionales con

fenotipo efector-memoria (Baev *et al.*, 2004; Godfrey *et al.*, 2010). El primer ligando descubierto para los NKT fue la α -Galactosilceramida (α GalCer, KRN7000), que demostró potentes propiedades antitumorales en ratones (Swann *et al.*, 2007; Kronenberg y Gapin, 2002; Benedelac *et al.*, 2007). A pesar del hecho de que la mayoría de los tumores sólidos tanto en seres humanos como en ratones son negativos para CD1d, el potencial antitumoral de los NKT se ha demostrado en numerosos modelos de cáncer (Swann *et al.*, 2007), aunque los resultados de los ensayos clínicos de fase I/II son todavía inconcluyentes más allá de la demostración de la seguridad (Nieda *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2005; Motohashi *et al.*, 2009; Kunii *et al.*, 2009). La infiltración de las células NKT de tumores primarios se asoció con un buen resultado en niños con neuroblastomas (NB) (Metelitsa *et al.*, 2004), un descubrimiento que se ha extendido desde ese momento a otras malignidades (Dhodapkar, 2009; Tachibana *et al.*, 2005; Moiling *et al.*, 2007). Los NKT se colocan con macrófagos asociados a tumor (TAM) en NB primarios y, después del reconocimiento de los glicolípidos derivados del tumor, matan específicamente a estas células de una manera dependiente de CD1d (Song *et al.*, 2009). Como los TAM proporcionan un soporte estromal crítico para el crecimiento de las células tumorales en muchos tipos de cáncer, la muerte de los TAM mediada por las células NKT explica cómo los NKT controlan indirectamente el crecimiento tumoral. Sin embargo, esto puede no ser suficiente para la erradicación del tumor.

Inmunoterapia con EBV-CTL CAR.GD2+. Las células T preparadas por ingeniería para forzar la expresión de proteínas quiméricas conocidas como receptores de antígenos quiméricos (CAR) pueden rendir un medio para combinar las propiedades de direccionamiento de los anticuerpos con la biodistribución y función efectora "activa" de las células T (Dotti *et al.*, 2009). Sobre la base de las observaciones de que los CTL específicos para EBV (EBV-CTL), sobreviven más de 10 años después de la transferencia adoptiva (Pule *et al.*, 2008), hay un estudio clínico realizado recientemente en el que pacientes con NB recidivante/refractario recibieron tanto EBV-CTL como células T autólogas (ATC), expresando cada una un CAR distinguible dirigido al antígeno GD2 expresado por neuroblastos. Los resultados demostraron que los EBV-CTL modificados por CAR tenían una persistencia y citotoxicidad superiores comparado con ATC modificados con CAR (Pule *et al.*, 2008; Louis *et al.*, 2011). La infusión de CTL CAR.GD2+ fue segura y produjo respuestas tumorales (incluyendo una remisión completa) en 4/8 pacientes con enfermedad recidivante/refractaria (Pule *et al.*, 2008). Algunos pacientes en este estudio también recibieron mAb anti-CD45 leukocyte-depleting como parte del acondicionamiento. Una de las observaciones más llamativas fue que las respuestas tumorales en dos de dichos pacientes que recibieron anti-CD45 estaban asociadas con necrosis tumoral rápida y extensa, que fue desproporcionada respecto al número de células T infiltrantes observado en biopsia. Esta observación clínica sugirió que el tomar como diana células que soportan el tumor de origen hematopoyético podría haber contribuido a la eficacia de la inmunoterapia frente a NB con CTL CAR.GD2+. Como los NKT se localizan activamente en los tumores de NB y matan a los TAM usando su especificidad nativa para TCR, en realizaciones de la presente invención, la expresión de CAR.GD2 en NKT terapéuticos les permite matar tanto a los TAM como a los neuroblastos que da lugar a la erradicación del tumor.

La importancia de la coestimulación para la función de las células T y NKT. En los ensayos en seres humanos iniciales, los linfocitos T que expresan CAR de primera generación mostraron una expansión limitada y una persistencia relativamente corta (Pule *et al.*, 2008; Till *et al.*, 2008; Kershaw *et al.*, 2006). Este resultado refleja posiblemente el fracaso de las moléculas CAR artificiales para activar completamente las células T después de la unión de antígeno en células tumorales, especialmente cuando las células tumorales carecen de la expresión de moléculas coestimuladoras (tales como CD80 y CD86) que se requieren para la activación sostenida, crecimiento y supervivencia de las células T (Zou, 2005). Para proporcionar la coestimulación que está ausente en las dianas de las células tumorales y superar de esta manera las limitaciones anteriores, varios grupos han incorporado endodominios coestimuladores, incluyendo CD28 y CD137 (Maher *et al.*, 2002; Porter *et al.*, 2011). En un ensayo clínico reportado recientemente, se infundió a pacientes con linfomas de células B simultáneamente 2 productos de células T autólogas que expresaban CAR con la misma especificidad para el antígeno CD19. Un CAR codificaba tanto el CD28 coestimulador como los endodominios ζ , mientras el otro solo codificaba el endodominio ζ . Las células T CAR⁺ que contenían el endodominio CD28 mostraron una expresión y persistencia aumentadas de forma llamativa comparado con las células T CAR⁺ que carecían de este endodominio (Savoldo *et al.*, 2011). Otro ensayo clínico reciente de fase I/IIa mostró que las células T preparadas por ingeniería para expresar CD19 CAR con el dominio coestimulador 4-1BB (CD137) inducían remisiones persistentes en pacientes con leucemia linfocítica crónica resistente, incluso aquellos con enfermedad voluminosa (Porter *et al.*, 2011). Existe una evidencia creciente de que la coestimulación juega un papel crítico en la activación, expansión, y supervivencia de los NKT. Varios reportes demostraron que las rutas B7:CD28, CD40:CD40L, y OX40:OX40L son importantes para la expansión y producción sistémica de citoquinas posterior por las células NKT (Uldrich *et al.*, 2005). Los NKT también expresan OX40 y la administración intratumoral de DC modificadas para expresar OX40L indujo la acumulación de células NKT dependiente de OX40 y la producción de IFN-gamma en el sitio tumoral, lo que produjo una supresión potente del crecimiento tumoral (Zaini *et al.*, 2007). CD137 no se expresa en NKT quiescentes, pero se indujo rápidamente después de la unión de TCR, y la estimulación de CD137 por un mAb agonista anti-4-1BB estimuló la activación de las células NKT, dando lugar a una producción aumentada de citoquinas de las células NKT en respuesta a α GalCer (Vinay *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008). Por lo tanto, en realizaciones de la invención, la expresión de CAR con endodominios coestimuladores derivados de CD28, OX40, y/o CD137 (como ejemplos) proporciona una coestimulación óptima, dando lugar a una eficacia antitumoral mejorada de los NKT modificados con CAR.

El papel de IL-15 en la homeostasis de las células NKT y aplicación potencial para la inmunoterapia del cáncer.

El microentorno tumoral puede afectar la viabilidad y función de las células NKT, lo que sugiere que una estrategia inmunoterapéutica efectiva con NKT debería considerar sus requerimientos homeostáticos. Los estudios en ratones han demostrado que el desarrollo de las células NKT y su mantenimiento homeostático dependen en gran medida de IL-15 (Matsuda *et al.*, 2002). IL-15 también estimula la proliferación y aumenta la supervivencia de los NKT humanos (Baev *et al.*, 2004). A diferencia de lo que ocurre en el ratón, sin embargo, los NKT humanos negativos para CD4 (en su mayor parte dobles negativos para CD8/CD4, DN), expresan niveles muchos mayores de IL-2R β que el subconjunto CD4+, de manera que IL-15 expande preferentemente los NKT DN (Baev *et al.*, 2004). De forma importante, los NKT DN son más citotóxicas que los NKT CD4+, y un reporte reciente demostró que solo se requieren los NKT DN para las respuestas antitumorales *in vivo* (Crowe *et al.*, 2005). IL-15 protege a los NKT humanos frente a la hipoxia y la expresión transgénica de IL-15 en NKT transferidos de forma adoptiva aumenta fuertemente su actividad antimetastásica en un modelo clínicamente relevante de NB en ratones humanizados NOD/SCID/IL-2Ry(null) (hu-NSG) (Liu *et al.*, 2012). Esto indica que la expresión de IL-15 en los NKT para propósitos terapéuticos soporta la expansión, persistencia, y actividad antitumoral de los NKT en pacientes con cáncer. En la presente invención, la coexpresión de IL-15 mejora la persistencia y actividad antitumoral *in vivo* de los NKT CAR.GD2.

Expresión del gen suicida de la Caspasa-9 inducible (iCasp-9) en células transgénicas. El uso de NKT que expresan IL15 en transferencia adoptiva clínica puede provocar preocupaciones potenciales debido a la transformación leucémica reportada en ratones transgénicos para IL-15 (Fehniger *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2011) y en un clon de células T humano (Hsu *et al.*, 2007). Aunque la transformación maligna de células T preparadas por ingeniería es un evento raro (Hsu *et al.*, 2007), se puede incorporar un gen suicida que permita la eliminación de las células transgénicas después de su activación farmacológica (Quintarelli *et al.*, 2007). La caspasa-9 es un activador principal aguas abajo de la apoptosis (Riedl y Salvesen, 2007), y el gen iCasp-9 se ha usado como un gen suicida para terapia con células T (Quintarelli *et al.*, 2007; Di *et al.*, 2011; Straathof *et al.*, 2005; Tey *et al.*, 2007). Brevemente, el ADNc de la caspasa-9 se fusiona en marco con un dominio de unión a FK506 humano de 12-kDa (FKBP12) que contiene una mutación F36V, permitiendo la dimerización de la caspasa-9 y la activación de la ruta apoptótica después de la exposición al análogo de FK506, AP1903. Las células T que expresan la molécula iCasp-9 se eliminan eficientemente después de la activación farmacológica del gen suicida tanto *in vitro* como *in vivo* (Quintarelli *et al.*, 2007; Tey *et al.*, 2007). Un ensayo clínico reportado recientemente ensayó la actividad y seguridad del sistema iCasp-9/AP1903 mediante la introducción del gen en células T donantes proporcionadas para aumentar la reconstitución inmune en receptores de trasplantes de células madre haploidentícos. Una única dosis de fármaco dimerizante, proporcionada a cuatro pacientes en los que se desarrolló GVHD, eliminó las células T modificadas y finalizó la GVHD sin recurrencia (Di *et al.*, 2011). Se puede emplear el mismo interruptor de seguridad para controlar los NKT modificados genéticamente en realizaciones de la invención.

La presente invención proporciona una solución para una necesidad presente desde hace tiempo en la técnica de métodos seguros y composiciones que sean adecuados para tomar como diana las células cancerosas y las células que soportan el entorno de las células cancerosas.

Resumen breve de la invención

La presente descripción está dirigida a métodos y composiciones asociadas con la terapia del cáncer, incluyendo terapia celular para el cáncer. En un aspecto, se proporciona una célula T asesina natural preparada por ingeniería que comprende una construcción de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido a GD2. Aunque el cáncer puede ser de cualquier clase, en realizaciones específicas, el cáncer es neuroblastoma o melanoma. En realizaciones particulares de la invención, se proporciona terapia celular para neuroblastoma. En realizaciones específicas, la terapia celular comprende terapia celular con células T Asesinas Naturales (NKT). En realizaciones particulares de la invención, existe direccionamiento de NKT a las células en un microentorno tumoral, tal como macrófagos asociados con tumor (TAM). También se proporciona direccionamiento de NKT a las células tumorales directamente. En algunas realizaciones, existe direccionamiento de NKT tanto a TAM como a células tumorales. En realizaciones específicas, hay células NKT que portan una o más construcciones de expresión que permiten que las células NKT tengan como diana un microentorno tumoral y/o células tumorales.

Así, hay células NKT que portan un receptor de antígeno quimérico que tiene como diana GD2 (ácido (2R,4R,5S,6S)-2-[3-[(2S,3S,4R,6S)-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-5-[(2S,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-2-[(2R,3S,4R,5R,6R)-4,5-dihidroxi-2-(hidroximetil)-6-[(E)-3-hidroxi-2-(octadecanoilamino)octadec-4-enoxi]oxan-3-il]oxi-3-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-4-il]oxi-3-amino-6-carboxi-4-hidroxioxan-2-il]-2,3-dihidroxipropoxi]-5-amino-4-hidroxi-6-(1,2,3-trihidroxipropil)oxano-2-carboxílico) expresado por las células cancerosas, y en realizaciones específicas las células cancerosas son células de neuroblastoma; en aspectos específicos, dichas células NKT retienen la capacidad de matar a los TAM y tienen especificidad para TCR. En realizaciones específicas, las células NKT expresan alternativamente o adicionalmente IL-15, IL-2, IL-4, IL-7, o una combinación de las mismas, tal como a partir de una construcción de expresión en las células. En realizaciones particulares, las células NKT comprenden un vector bi/tricistónico que codifica CAR.GD2, opcionalmente codifica un endodominio coestimulador; que codifica IL-15; y que comprende opcionalmente un interruptor suicida, tal como un interruptor suicida inducible.

En algunas realizaciones de la invención, hay una célula T asesina natural preparada por ingeniería que comprende un ADNc seleccionado del grupo que consiste en un ADNc de IL-2, un ADNc de IL-4, un ADNc de IL-7, un ADNc de

IL-15, o una mezcla de los mismos. En realizaciones específicas, el ADNc es un ADNc de IL-2 o un ADNc de IL-15, incluyendo de seres humanos. En realizaciones específicas, la célula engloba una construcción de expresión que comprende además un gen suicida inducible, tal como un gen suicida de caspasa-9 inducible o el gen suicida inducible es timidina quinasa (sr39 TK). En una realización específica, la célula comprende además una etiqueta CD34.

- 5 En algunas realizaciones de la invención, hay un método para tratar un cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de células NKT de la invención a un sujeto que lo necesita. En los métodos, la célula NKT puede comprender un gen suicida inducible. En realizaciones específicas del método, comprende además la etapa de inducir la eliminación de la célula T asesina natural administrada mediante la activación del gen suicida inducible. En realizaciones específicas, el gen suicida inducible es el gen suicida de la caspasa-9 inducible. El método
10 puede comprender además administrar AP20187, AP1903, o una mezcla de los mismos al sujeto para activar el gen suicida de la caspasa-9 inducible. En algunos casos, el gen suicida inducible es timidina quinasa (sr39 TK) y el método comprende además administrar ganciclovir al sujeto para activar la timidina quinasa.

- En algunas realizaciones del método, el individuo necesita tratamiento para el cáncer y en realizaciones específicas el cáncer es un tumor; en casos particulares, el microentorno tumoral es hipóxico, tal como que comprende menos del
15 15 % de O₂, menos del 10 % de O₂, menos del 5 % de O₂, menos del 4 % de O₂, menos del 3 % de O₂, menos del 2 % de O₂, o menos del 1 % de O₂.

- En realizaciones específicas, el cáncer que se va a tratar se selecciona del grupo que consiste en neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer endometrial, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de próstata, tumores hematopoyéticos del linaje linfóide,
20 leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia mieloide, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica, cáncer de tiroides, cáncer de tiroides folicular, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimal, fibrosarcoma, rabdomiosarcomas, melanoma, melanoma uveal, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, tumor benigno de la piel, cáncer renal, linfoma de células grandes anaplásico, carcinoma de
25 células escamosas del esófago, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células dendríticas folicular, cáncer intestinal, cáncer invasivo muscular, tumor de la vesícula seminal, carcinoma epidérmico, cáncer de bazo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de la retina, cáncer biliar, cáncer del intestino delgado, cáncer de las glándulas salivares, cáncer de útero, cáncer de testículos, cáncer de tejido conectivo, hipertrofia prostática, mielodisplasia, macroglobulinemia de Waldenstrom,
30 nasofaringeo, cáncer neuroendocrino síndrome mielodisplásico, mesotelioma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, carcinoide, esofágico-gástrico, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer peritoneal, cáncer mulleriano seroso papilar, ascitis maligno, tumor estromal gastrointestinal (GIST), y un síndrome de cáncer hereditario seleccionado de síndrome de Li-Fraumeni y síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL).

- En métodos particulares de la invención, la célula T asesina natural deriva de células del sujeto que se está tratando, aunque la célula puede provenir de otro individuo. En algunos casos de la invención, la administración de las células es sistémica, y la administración puede ser parenteral en algunos casos. En realizaciones particulares, la célula T asesina natural se administra localmente en el tumor. En algunas realizaciones de los métodos, estos comprenden además administrar terapias para el cáncer adicionales al sujeto.

- En algunas realizaciones, hay una célula T asesina natural preparada por ingeniería que comprende una construcción de expresión que codifica IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, o una combinación de las mismas. En realizaciones específicas, la construcción codifica IL-2 o IL-15. En determinadas realizaciones, la construcción codifica IL-15, incluyendo IL-15 humana, por ejemplo. En casos particulares, la construcción de expresión comprende o es un vector, tal como un vector retroviral, vector lentiviral, vector adenoviral, vector viral adeno-asociado, o plásmido.

- La célula NKT de la presente descripción comprende una construcción de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que tiene como diana GD2. En realizaciones específicas, el CAR comprende endodominios coestimuladores seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137, OX40, CD40, o una combinación de los mismos. En realizaciones particulares, la construcción de expresión que codifica IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, o una combinación de las mismas y la construcción de expresión que codifica un CAR que tiene como diana GD2 son la misma construcción. En realizaciones específicas, la expresión de IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, o una combinación de las
50 mismas y la expresión del CAR están reguladas por la misma secuencia o secuencias reguladoras. La construcción de expresión comprende un gen suicida inducible, en casos particulares, tal como un gen suicida de caspasa-9 inducible o donde el gen suicida inducible es timidina quinasa (sr39 TK). En casos específicos, de la célula, la célula NKT comprende una etiqueta CD34.

- En algunas realizaciones, hay un método para tratar un cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una célula NKT preparada por ingeniería a un sujeto que lo necesita. En realizaciones específicas, la célula T asesina natural comprende un gen suicida inducible. En algunas realizaciones, del método este comprende además la etapa de inducir la eliminación de la célula T asesina natural administrada mediante la activación del gen suicida inducible. En algunos casos, el gen suicida inducible es gen suicida de caspasa-9 inducible y el método comprende además administrar AP20187, AP1903, o una mezcla de los mismos al sujeto para activar el
60 gen suicida de caspasa-9 inducible. En algunos casos, el gen suicida inducible es timidina quinasa (sr39 TK) y el

método comprende además administrar ganciclovir al sujeto para activar la timidina quinasa. En algunos casos de los métodos de la invención, la célula NKT comprende una etiqueta CD34.

En algunos métodos de la invención, el cáncer es un tumor y en aspectos particulares el microentorno tumoral es hipóxico. En determinados casos, el microentorno tumoral comprende menos del 15 % de O₂, menos del 10 % de O₂, menos del 5 % de O₂, menos del 4 % de O₂, menos del 3 % de O₂, menos del 2 % de O₂, o menos del 1 % de O₂. En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer endometrial, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de próstata, tumores hematopoyéticos del linaje linfóide, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia mieloide, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica, cáncer de tiroides, cáncer de tiroides folicular, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimal, fibrosarcoma, rabdoidosarcomas, melanoma, melanoma uveal, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, tumor benigno de la piel, cáncer renal, linfoma de células grandes anaplásico, carcinoma de células escamosas del esófago, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células dendríticas folicular, cáncer intestinal, cáncer invasivo muscular, tumor de la vesícula seminal, carcinoma epidérmico, cáncer de bazo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de la retina, cáncer biliar, cáncer del intestino delgado, cáncer de las glándulas salivares, cáncer de útero, cáncer de testículos, cáncer de tejido conectivo, hipertrofia prostática, mielodisplasia, macroglobulinemia de Waldenstrom, nasofaríngeo, cáncer neuroendocrino, síndrome mielodisplásico, mesotelioma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, carcinoide, esofágico-gástrico, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer peritoneal, cáncer mulleriano seroso papilar, ascitis maligno, tumor estromal gastrointestinal (GIST), y un síndrome de cáncer hereditario seleccionado de síndrome de Li-Fraumeni y síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL). El cáncer es un neuroblastoma en realizaciones particulares. En algunos casos, la IL-15 es IL-15 humana. Las células NKT pueden derivar de células del sujeto o de otro individuo. La administración de las células puede ser sistémica o parenteral. En determinados aspectos, la célula T asesina natural se administra localmente en el tumor. En algunos casos, el método comprende además administrar una o más terapias adicionales para el cáncer al sujeto.

Lo anterior ha resumido bastante ampliamente las características y ventajas técnicas de la presente invención con el fin de que la descripción detallada de la invención que sigue pueda entenderse mejor. En la presente memoria se describirán posteriormente las características y ventajas adicionales de la invención que forman el contenido de las reivindicaciones de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que la concepción y realización específica descrita puede utilizarse fácilmente como una base para modificar o diseñar otras estructuras para llevar a cabo los mismos propósitos de la presente invención. Los expertos en la técnica también deben ser conscientes de que dichas construcciones equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la invención como se muestra en las reivindicaciones adjuntas. Las nuevas características que se cree que son características de la invención, tanto respecto a su organización como método de operación, junto con los objetos y ventajas adicionales se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción. Debe entenderse expresamente, sin embargo, que la descripción se proporciona solo para el propósito de ilustración y descripción y no se pretende como una definición de los límites de la presente invención.

Descripción de los dibujos

Figura 1: el contacto con células de NB e hipoxia induce sinérgicamente CCL20 en monocitos humanos. (A) Se cocultivaron monocitos primarios con células de NB CHLA-255 (relación 1:1) durante 48 hr en condiciones normóxicas (20 % de O₂) o hipóxicas (1 % de O₂) y los sobrenadantes se pusieron en cámaras inferiores de placas con cámaras duales con membranas con poros de 5 µm con o sin la adición de los anticuerpos neutralizantes indicados o su control de isotipo. Los NKT se pusieron en las cámaras superiores y se dejó que migraran durante 3 h. La tasa de la migración de las células NKT se cuantificó por FACS. Los resultados son Media ± SD de 3 experimentos en triplicado, **p < 0.01, ***P < 0.001, ANOVA de una vía. (B) Los monocitos se cocultivaron con o sin células de NB CHLA-255 durante 36 h en condiciones normóxicas o hipóxicas seguido del aislamiento del ARNm y análisis por PCR en tiempo real cuantitativa de 11 genes de quimioquinas que se sabe que atraen a los NKT humanos. Los datos son de un representante de 3 experimentos en triplicado. (C) Los monocitos se cultivaron solos o con células de NB CHLA-255 en condiciones hipóxicas o normóxicas durante 48 h. La concentración de CCL20 se cuantificó en los sobrenadantes de las condiciones indicadas usando ELISA. (D) Las células se cultivaron como en C y se analizaron para determinar la acumulación intracelular de CCL20 en monocitos CD14⁺ y células de NB CD14^{neg}. Las regiones se ajustaron usando los controles de isotipo correspondientes. (E). Los leucocitos infiltrantes en el tumor se aislaron de una suspensión celular de NB primario recién reseccionado por una centrifugación en gradiente y se cultivaron con GolgiStop™ durante 4 h seguido por FACS. Después de seleccionar eventos CD45⁺, la acumulación de CCL20 se examinó en TAM CD14⁺ (representación inferior) y se comparó con el control de isotipo correspondiente (representación superior). Los datos son de representante de tres experimentos.

Figura 2: CCL20 se requiere para la migración de las células NKT hacia el cultivo de NB/monocitos hipóxico y tumores NB en ratones hu-NSG. (A) Se cocultivaron monocitos con células de NB CHLA-255 durante 48 hr en condiciones normóxicas o hipóxicas seguido de análisis de la migración de las células NKT *in vitro* con o sin los anticuerpos neutralizantes indicados o su control de isotipo como en la Fig. 1A. Los resultados son Media ± SD de 3 experimentos en triplicado, P < 0.001, ANOVA de una vía. (B) Se establecieron xenoinjertos de células CHLA255/luc bajo la cápsula

renal de ratones huNSG seguido de la transferencia i/v de NKT humanos expandidos ex-vivo (5×10^7 por ratón) o PBS (control). Justo antes de la transferencia de las células NKT, los ratones recibieron inyecciones i/p de los anticuerpos neutralizantes indicados o su control de isotipo. Los leucocitos infiltrantes en el tumor se analizaron por FACS en el día 3 después de la transferencia de las células NKT. Después de seleccionar células hCD45⁺, los NKT se identificaron como eventos CD3⁺Va24-Ja18⁺. Los datos son de un representante de cinco ratones por grupo. (C) Los gráficos de barras representan valores $M \pm SD$ de la frecuencia de las células NKT infiltrantes en el tumor del experimento descrito en B. **p<0.01, ***P<0.001, ANOVA de una vía.

Figura 3: TNF α mb en células de NB induce la activación de NF- κ B en monocitos. (A) Las células de NB cultivadas se suspendieron usando 2 % de EDTA sin tripsina y se analizaron por FACS para determinar la expresión en la superficie celular de TNF α mb en dos líneas celulares de NB representativas (con color: control de isotipo, sin color: anti-TNF α mb). (B) Las suspensiones celulares de tumores de NB recién reseccionados se tiñeron para los marcadores de superficie indicados. La expresión de TNF α mb en la célula de NB (derecha) se analizó después de seleccionar eventos CD56^{alto}CD45^{neg} (izquierda). (C) Las células de NB se preincubaron con 50 ng/mL de mAb anti-TNF α humano (Clon 1825, R&D system) o control de isotipo durante 1 hr antes de la adición de monocitos. Se usaron NB y monocitos solos como controles. La concentración de CCL20 en el sobrenadante del cultivo se determinó por ELISA después de 36 h. Los resultados son Media $\pm$ SD de 3 experimentos en triplicado, ***P<0.001, ANOVA de una vía (D). Los monocitos se cultivaron solos en placas no adherentes o en la parte superior de una monocapa de células de NB y con la adición (cuando se indica) de mAb anti-TNF α o control de isotipo en normoxia o hipoxia durante 16 h seguido del desprendimiento de los monocitos y transferencia western para plkB α usando β -actina como control de carga. (E) El experimento se ajustó como en 0 seguido de la tinción intracelular para I κ B α o (F) fosfo-p65 en monocitos después de seleccionar células de NB como eventos CD56^{alto}. (G) Cinética de la expresión de fosfo-p65 en monocitos después de cocultivo con células de NB en condiciones normóxicas e hipóxicas. Los datos son de un representante de tres experimentos.

Figura 4: la viabilidad y función de las células NKT se inhiben por hipoxia y están protegidas por citoquinas. (A) Se cultivaron NKT sin estimular bajo hipoxia o normoxia en presencia o ausencia de las citoquinas indicadas a 200 U/ml durante 24 h. La viabilidad celular se evaluó por tinción con azul de tripán. B. Los NKT se cultivaron durante 24 h como en A seguido de estimulación de TCR con mAb 6B11. La liberación de citoquinas se cuantificó por el ensayo CBAPlex en sobrenadantes de 24-hr. La cantidad de citoquinas se normalizó por el porcentaje de células viables en las condiciones correspondientes. Los resultados son Media $\pm$ SD de 3 experimentos en triplicado, **P<0.01 ***P<0.001, ANOVA de una vía.

Figura 5. La expresión transgénica de IL-15 en NKT les protege frente a la hipoxia. (A) Esquema de la construcción retroviral usada para transducir NKT. Los NKT proliferantes se transdujeron con el vector retroviral que contenía IL-15 y las células transducidas se identificaron por FACS usando la etiqueta Δ CD34. (B) Las células NKT y NKT/IL15 se marcaron con CFSE y se estimuló TCR con mAb OKT3 en ausencia o presencia de células de NB (relación 1:1) en normoxia o hipoxia (1 mln células/pocillo). El porcentaje de células que habían proliferado (pérdida de la expresión de CFSE) se cuantificó por FACS después de un cultivo de 5 días con IL-2 (50 U/ml). Los datos son de un representante de cuatro experimentos con NKT de cuatro donantes. (C) El número absoluto de NKT viables se cuantificó después de un cultivo de 5 días usando hemocitómetro y tinción con azul de tripán. Se muestran la Media $\pm$ SD de células por condición de cuatro experimentos, **P<0.01 ***P<0.001.

Figura 6. Los NKT transducidos con IL-15 tienen una actividad antitumoral potente en un modelo de NB metastásico en ratones hu-NSG. Los ratones NSG se irradiaron subletalmente y se trasplantaron con células madre CD34⁺ de sangre de cordón humano (hu-NSG) o se usaron como un control (NSG). Tres meses después de la transferencia de las células madre, los ratones recibieron una inyección i/v de 10^6 células de NB CHLA-255/luc solas o seguido de 10^7 células NKT o NKT/IL-15. El crecimiento de tumor metastásico se monitorizó por imagen BL semanal. (A) Imágenes BL representativas de ratones en cada grupo a los intervalos de tiempo indicados después de la inyección de las células tumorales. (B) Valores $M \pm SD$ de uno de dos experimentos con 5 ratones por grupo. ***P<0.001. (C) Los ratones se pretrataron con mAb de bloqueo anti-CD1d o control de isotipo antes de la transferencia de células NKT/IL15. Valores $M \pm SD$ en la semana 5 de uno de dos experimentos con 5 ratones por grupo. *P<0.05, ***P<0.001.

Figura 7: el contacto con células de NB e hipoxia induce sinérgicamente CCL20 en monocitos humanos. (A) Los monocitos del donante 3 se cocultivaron con células de NB CHLA-255 bajo condiciones normóxicas o hipóxicas. Los sobrenadantes se recogieron a los puntos de tiempo indicados y la concentración de CCL20 se midió por ELISA. (B) Los monocitos del donante 11 y las células de NB se cultivaron solos o se cocultivaron en los mismos pocillos o en cámaras Transwell, separados por una membrana de 0.4 μ m durante 36 h. La concentración de CCL20 se midió por ELISA. Los datos son de un representante de tres experimentos. (C) Los monocitos y las células de NB se cultivaron solos o se cocultivaron en los mismos pocillos o en cámaras Transwell, separados por una membrana de 0.4 μ m durante 36 h. La concentración de CCL20 se midió por ELISA. Los datos son de un representante de tres experimentos.

Figura 8: expresión de CCR6 en células NKT. Las células NKT primarias de PBMC recién aisladas de dos individuos (PBMC-1 y 2) y las células NKT expandidas ex vivo (línea NKT) se identificaron por FACS como eventos CD3⁺Va24-Ja18⁺ (panel izquierdo) y se analizaron para determinar la expresión de CD4 y CCR6 (panel derecho).

Figura 9: modelo de neuroblastoma en ratones hu-NSG. (A) Se irradiaron subletalmente ratones NSG se seis semanas de edad y se trasplantaron con células madre hematopoyéticas (SCT) CD34+ de sangre del cordón humano. Los monocitos y células B humanas aparecieron en la sangre periférica a los 2 meses y las células T a los 3 meses después de SCT. Se inyectaron células de NB bien bajo la cápsula renal o intravenosamente (modelo metastásico) a los 3.5 meses después de SCT. La transferencia adoptiva de células NKT se realizó a diferentes intervalos después de la inyección de las células tumorales dependiendo del ajuste experimental. (B) Después de dos rondas de selección positiva, las preparaciones de células madre de sangre del cordón tenían >95 % de células madre CD34+ y <0.1 % de células T CD3+. (C) Las representaciones representativas demuestran una reconstitución típica de monocitos, linfocitos T y B en sangre periférica de ratones hu-NSG en el momento de la inyección de las células de NB. (D) Tinción IF del injerto de NB con mAb anti-CD45 humano (rojo), aumento X20. (E) Análisis por FACS de las células viables en la suspensión tumoral para CD45 y CD14 humanos. (F) Las células monocíticas CD14+ se analizaron para determinar el nivel de la expresión de HLA-DR en sangre periférica (izquierda) y en injertos de tumores de NB de los mismos animales. Se muestra un representante de cinco ratones. (G) La expresión de HLA-DR (parte inferior) se analizó en TAM de tumor de NB humano primario después de seleccionar células CD45+CD33+CD14+ (parte superior). Se muestra un representante de tres tumores primarios.

Figura 10. Modelo de neuroblastoma en ratones hu-NSG. (A) Se irradiaron subletalmente ratones NSG se seis semanas de edad y se trasplantaron con células madre hematopoyéticas (SCT) CD34+ de sangre del cordón humano. Los monocitos y células B humanas aparecieron en la sangre periférica a los 2 meses y las células T a los 3 meses después de SCT. Se inyectaron células de NB CHLA-255/luc bien bajo la cápsula renal (modelo ortotópico) o intravenosamente (modelo metastásico) a los 3.5 meses después de SCT. La transferencia adoptiva de células NKT se realizó a diferentes intervalos después de la inyección de las células tumorales dependiendo del ajuste experimental. (B) El crecimiento de tumor metastásico de las células CHLA-255/luc se comparó en ratones hu-NSG frente a ratones NSG. Los datos de imaginología BL semanal son de un representante de 5 ratones por grupo (C) Las representaciones representativas demuestran una reconstitución típica de monocitos, linfocitos T y B en sangre periférica de ratones hu-NSG en el momento de la inyección de las células de NB. (D) Tinción IF del injerto de NB con mAb anti-CD45 humano (rojo), aumento X20. (E) Análisis por FACS de las células viables en la suspensión tumoral para CD45 y CD14 humanos (TAM). (F). Se inyectaron i/v NKT humanos expandidos *ex-vivo* (5×10^7 por ratón) o PBS (control) en ratones hu-NSG que presentaban injertos de NB ortotópicos establecidos de 3 semanas. Los leucocitos infiltrantes de tumor se analizaron por FACS en el día 3 después de la transferencia de las células NKT. Después de seleccionar células hCD45⁺, los NKT se identificaron como eventos CD3⁺Va24-Ja18⁺. Los datos son de un representante de cinco ratones por grupo.

Figura 11. Expresión de GD2.CAR funcionales en NKT. (A) Representación esquemática de CAR que incorporan restos coestimuladores. (B) Expresión típica de una de las construcciones CAR (14g2a.CD28.OX40.zeta) en NKT expandidos *ex vivo* en los días 7 y 21 después de la transducción retroviral según se detecta usando un anticuerpo anti-idiotipo específico, 1A7⁹. (C) Citotoxicidad *in vitro* de NKT CAR.GD2 y células T del mismo individuo frente a células de NB GD2+ CHLA-255 en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 hr. (D) Citotoxicidad *in vitro* de NKT CAR.GD2 y parentales frente a células J32 CD1d+ en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 hr. Se muestran representantes de tres experimentos independientes.

Figura 12. La activación farmacológica del gen suicida iCasp-9 elimina eficientemente las células T modificadas genéticamente en pacientes con leucemia. (A) Análisis por FACS para células T transducidas con iCasp9 de cinco pacientes que reciben terapia celular después del trasplante de células madre haploide para HLA para leucemia recidivante. Los pacientes 1, 2, 4 y 5 con alto nivel de injerto desarrollaron GvHD de piel/hígado y recibieron una única dosis del fármaco dimerizante AP1903. (B) Copias del transgén *iCasp9* por µg de ADN de células mononucleares de sangre periférica, evaluadas por amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real, para cada paciente en los puntos de tiempo correspondientes a aquellos en el panel B, antes y después de la infusión de AP1903.

Figura 13. Construcción de vector retroviral tricistrónico que expresa iCasp9/CAR.GD2/IL-15. Los genes indicados se unieron conjuntamente usando péptidos de secuencia 2A derivados del virus de la enfermedad de pie y boca, y se clonaron en el vector retroviral SFG para generar el CAR.GD2 coexpresado con IL-15 y el gen suicida inducible caspasa-9 (iCasp9/CAR.GD2-CD28/IL-15) en un vector retroviral.

La Figura 14 muestra la generación y expansión efectivas de NKT CAR.GD2. La Figura 15 muestra que los NKT CAR.GD2 están dotados de especificidad dual frente a las dianas GD2+ y CD1d+.

La Figura 16 demuestra que los endodominios coestimuladores en las construcciones CAR.GD2 afectan el perfil de citoquinas de las células NKT.

La Figura 17 muestra que los endodominios coestimuladores en las construcciones CAR.GD2 afectan las rutas de señalización Th1 y Th2 en los NKT.

La Figura 18 muestra la eficacia terapéutica de NKT CAR.GD2 frente a metástasis de NB en ratones hu-NSG.

La Figura 19 muestra la expresión intracelular de TNFα en líneas celulares de NB. Las células cultivadas de las líneas celulares de NB humano indicadas se fijaron y permeabilizaron seguido de tinción intracelular con mAb anti-TNFα

conjugado con PE (transparente) o control de isotipo (gris). Se muestran representaciones de FACS representativas de uno de tres experimentos independientes.

La Figura 20 muestra el efecto diferencial de IL-15 en la apoptosis de las células NKT en normoxia e hipoxia. (A) los NKT se expandieron a partir de PBMC usando estimulación con α GalCer e IL-2 durante 7 días, después se lavaron y se cultivaron en ausencia o presencia de células de NB (relación 1:1) en normoxia o hipoxia, con o sin IL-15 a 10 ng/ml durante 24 h seguido de tinción para Anexina-V y 7-AAD. Se muestran representaciones de FACS representativas de uno de cuatro experimentos independientes. (B) Media $\pm$ SD de 4 experimentos, **P<0.01 ***P<0.001.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

- Conforme a la convención de leyes de patentes inveterada, las palabras "un" y "una" cuando se usan en la presente memoria descriptiva en concierto con la palabra que comprende, incluyendo las reivindicaciones, indican "uno o más". Algunas realizaciones de la invención pueden consistir en o consistir esencialmente en uno o más elementos, etapas del método, y/o métodos de la invención. Se contempla que cualquier método o composición descrito en la presente memoria puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descrito en la presente memoria.
- El término "cantidad terapéuticamente efectiva", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la cantidad que, cuando se administra a un sujeto o paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para llevar a cabo dicho tratamiento para la enfermedad, incluyendo para mejorar al menos un síntoma de la enfermedad.

II. Determinadas realizaciones de la invención

- Las células T Asesinas Naturales (NKT) que se infiltran en tumores están asociadas con buenos resultados en diversos cánceres. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los NKT interaccionan con los microentornos tumorales han permanecido enigmáticos impidiendo el diseño racional de inmunoterapias basadas en NKT. Los NKT se colocan con macrófagos asociados a tumores en una respuesta innata identificada recientemente a la hipoxia inducida por los tumores. Esta descripción proporciona la preparación por ingeniería de NKT. En realizaciones específicas, los NKT se preparan por ingeniería para los propósitos de aumentar su crecimiento bajo condiciones hipóxicas y/o facilitar su actividad antitumoral.

- La hipoxia es una característica fundamental de los tumores malignos tales como neuroblastoma que reduce la eficacia de los agentes terapéuticos convencionales. Los inventores han identificado una nueva respuesta inmune innata frente a la hipoxia inducida por tumores, y en realizaciones de la invención se presenta una manipulación de las células efectoras de esta respuesta para proporcionar inmunoterapia para el cáncer. La invención proporciona conocimientos críticos sobre los mecanismos por los cuales los linfocitos NKT se infiltran en los tumores e interaccionan con el microentorno hipóxico tumoral. Se puede aplicar la tecnología innovadora de preparar por ingeniería células para tomar como diana selectivamente tejidos hipóxicos en el interior del neuroblastoma (por ejemplo) para inmunoterapia con NKT. Estas células preparadas por ingeniería pueden combinarse con otras formas de inmunoterapia, tales como células T específicas de tumor, por ejemplo. La terapia con células NKT que tiene como diana la hipoxia es ampliamente aplicable en diversos tipos de cáncer en niños y adultos.

- Así, sobre la base de la experiencia con 1) NKT humanos, 2) construcciones de fusión con un dominio de degradación dependiente de oxígeno, y 3) receptores de antígenos quiméricos (CAR) para terapia con células T, se puede 1) descubrir el mecanismo de la localización de las células NKT en tumores hipóxicos; 2) preparar por ingeniería NKT, por ejemplo, para expresar determinados compuestos de una manera dependiente de oxígeno para mejorar su supervivencia y actividad antitumoral; y 3) evaluar la inmunoterapia combinada con NKT y células T-CAR específicas de tumor.

Las realizaciones de la presente invención engloban tomar como diana el microentorno tumoral y/o tomar como diana las células tumorales por células NKT. En algunas realizaciones, las células NKT se preparan por ingeniería para expresar IL-15, IL-2, IL-4, y/o IL-7.

- En realizaciones de la invención, se presenta una inmunoterapia efectiva para el cáncer usando NKT según la presente descripción que incrementan su capacidad de atacar tanto a células tumorales como de atacar a los tejidos que soportan su crecimiento. Los NKT se localizan en el sitio tumoral en pacientes con neuroblastoma, por ejemplo, y atacan a células no malignas denominadas macrófagos asociados a tumores, que proporcionan un soporte crítico para la supervivencia y crecimiento de las células tumorales. Para funcionar bien, los NKT deben sobrevivir en un entorno hostil, después de ingeniería genética con un factor de supervivencia tal como IL-15 y/o con una molécula que tiene el cáncer como diana denominada CAR.GD2, los NKT sobrevivirán en el sitio tumoral y tendrán eficacia antitumoral tanto para matar al cáncer directamente como para disrumpir el entorno de soporte. Como prueba de principio, los NKT de pacientes con neuroblastoma se prepararon por ingeniería de manera que pudieran producir IL-15 y tener en su superficie nuevos componentes (CAR.GD2) que pueden reconocer las células tumorales directamente. El uso antitumoral de estos NKT preparados por ingeniería se caracteriza usando sistemas experimentales *in vitro* e *in vivo*. Se pueden utilizar los NKT modificados genéticamente en pacientes con neuroblastoma.

La presente descripción incluye NKT humanos modificados genéticamente y una nueva estrategia inmunoterapéutica para emplearlos. En realizaciones específicas, los NKT que tienen como diana los TAM están provistos con una especificidad adicional frente a los neuroblastos usando CAR.GD2, que en sí mismo ha mostrado ser efectivo en pacientes con NB recurrente cuando se expresan por células T citotóxicas. La expresión de IL-15 en NKT facilita la supervivencia y la actividad antitumoral de las células NKT en pacientes con cáncer. Además, en algunas realizaciones, está presente un interruptor suicida en vectores en los NKT para asegurar la seguridad del uso clínico posterior de los NKT modificados genéticamente. Puede utilizarse un modelo único de NB en ratones humanizados que permite la evaluación de la localización tumoral de los NKT humanos y su interacción no solo con células de NB humanas sino también con TAM humanos en los tejidos tumorales. La construcción CAR.GD2 seleccionada puede fabricarse como material de grado clínico, en determinados aspectos. Debido a su capacidad inherente de tomar como diana el estroma que soporta los tumores, los NKT CAR, en algunas realizaciones, son más efectivos que las células T CAR en muchas malignidades de adultos y pediátricas. Por lo tanto, una plataforma terapéutica basada en células NKT permite un efecto mayor en la terapia celular para el cáncer.

En la presente descripción, se presenta una inmunoterapia efectiva para el cáncer usando las propiedades naturales y consecuentes a la preparación por ingeniería de células T Asesinas Naturales (NKT) con Vα24 invariable reactivas para CD1d para tomar como diana tanto las células estromales que soportan los tumores como las células tumorales en sí mismas. Los NKT que se infiltran en tumores están asociadas con buenos resultados en diversos cánceres. Los descubrimientos recientes sugieren que, en lugar de atacar a las células tumorales directamente, los NKT tienen como diana los macrófagos asociados a tumores (TAM) positivos para CD1d, que proporcionan un soporte estromal esencial para las células tumorales. Los NKT están atraídos por y se inhiben por TAM hipóxicos en neuroblastoma (NB) y su actividad antimetastásica puede rescatarse por la expresión transgénica de IL-15. Sin embargo, además de atacar al estroma que soporta a los tumores, la terapia curativa también puede requerir un ataque directo y específico frente a las células tumorales. Así, la invención proporciona NKT humanos transducidos con un receptor de antígeno quimérico (CAR) que tiene como diana el antígeno GD2 expresado por los neuroblastos (CAR.GD2) y representa una diana terapéutica clínicamente validada en NB. La expresión transgénica de CAR.GD2 hace que los NKT sean altamente citotóxicos frente a los neuroblastos mientras retienen la especificidad de TCR nativa y la capacidad de matar a los TAM. Sobre la base de los éxitos clínicos recientes con células T CAR, se generaron nuevas construcciones CAR.GD2 que codifican endodominios coestimuladores (CD28, OX40, o CD137) con o sin IL-15. Para asegurar la seguridad y aplicabilidad clínica de la modificación genética, las realizaciones de la invención engloban la expresión transgénica de CAR.GD2 e IL-15 con la expresión de la caspasa-9 inducible ejemplar, formando un interruptor suicida. Por lo tanto, las realizaciones de la invención incluyen un vector bi/tricistronico que codifica CAR.GD2 que contiene un endodominio coestimulador y/o IL-15 acoplado con el interruptor suicida inducible, ya que dichos NKT muestran una supervivencia y funciones efectoras antitumorales aumentadas de forma segura en el microentorno del tumor de NB. También están englobados en la descripción modelos de NB ortotópico y metastásico en ratones humanizados que permiten el ensayo *in vivo* de la actividad de las células NKT con especificidad dual frente a injertos de NB humanos que contienen TAM humanos.

III. Realizaciones de receptores quiméricos de la invención y usos de los mismos

En algunas realizaciones, las células NKT se preparan por ingeniería para comprender una construcción de expresión que codifica IL-15, IL-2, IL-4, y/o IL-7.

En realizaciones de la invención, se utiliza un receptor de antígeno quimérico (CAR) que tiene como diana GD2 que es una fusión preparada por ingeniería de fragmentos variables de cadena única (scFv), derivados de anticuerpos monoclonales, que se fusionan al dominio transmembrana CD3-zeta (por ejemplo) y endodominio(s) intracelular(es). En casos específicos, se presentan construcciones de expresión que codifican dichos receptores quiméricos. Las construcciones de expresión están presentes en una célula NKT.

En realizaciones específicas, las moléculas CAR dan lugar a la transmisión de una señal zeta en respuesta al reconocimiento por el scFv de su diana. Un ejemplo de dicha diana es el disialogangliósido GD2, por ejemplo. Las células NKT pueden transducirse con una construcción de expresión que codifica el CAR, y dicha transducción puede ser transducción con vector oncoretroviral, por ejemplo. El uso de la célula NKT le permite entonces reconocer y matar a las células diana que expresan GD2 (p. ej., células de neuroblastoma).

Aunque en realizaciones particulares se emplea cualquier dominio intracelular adecuado en los receptores quiméricos de la invención, en realizaciones específicas es parte o todo de la cadena zeta de CD3. En realizaciones específicas, los dominios de señalización intracelular del receptor son aquellos del complejo del receptor de antígenos de las células T, tales como la cadena zeta de CD3, también dominios de señalización coestimuladores de Fcγ RIII, CD28, DAP10, CD2, solos o en una serie con CD3zeta, por ejemplo. En realizaciones específicas, el dominio intracelular (que puede referirse como el dominio citoplásmico) comprende parte o todo de uno o más de la cadena zeta de TCR, CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, FcεR1γ, ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132, y CD40. Pueden emplearse uno o múltiples dominios citoplásmicos, ya que los denominados CAR de tercera generación tienen al menos 2 o 3 dominios de señalización fusionados conjuntamente para un efecto aditivo o sinérgico, por ejemplo.

Puede producirse un inmunorreceptor por cualquier medio conocido en la técnica, aunque se produce preferiblemente usando técnicas de ADN recombinante. Una secuencia de ácido nucleico que codifica las diferentes regiones del

receptor quimérico puede prepararse y ensamblarse en una secuencia codificadora completa por técnicas estándar de clonación molecular (cribado de bibliotecas genómicas, PCR, ligación asistida por cebador, mutagénesis dirigida a sitio, etc.). La región codificadora resultante se inserta preferiblemente en un vector de expresión y se usa para transformar una línea celular huésped de expresión adecuada, preferiblemente células NKT, y las células NKT pueden ser autólogas, en determinados aspectos, aunque en otros casos pueden ser alogénicas.

Las dosis adecuadas para un efecto terapéutico estarían entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^9 células por dosis, preferiblemente en una serie de ciclos de dosificación. Un régimen de dosificación preferido consiste en cuatro ciclos de dosificación de una semana de dosis crecientes, empezando a aproximadamente 10^7 células en el Día 0, incrementando gradualmente hasta una dosis diana de aproximadamente 10^8 células sobre el Día 5. Los modos de administración adecuados incluyen intravenoso, subcutáneo, intracavitario (por ejemplo, por un dispositivo con acceso a reservorio), intraperitoneal, e inyección directa en una masa tumoral.

Tal y como se usa en la presente memoria, una construcción de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico se pretende que signifique una molécula de ADN que puede transformarse o introducirse en una célula NKT y ser transcrita y traducida para producir un producto (p. ej., un receptor quimérico).

En la construcción de ácido nucleico empleada en la presente invención, el promotor está unido de forma operativa a la secuencia de ácido nucleico que codifica el receptor quimérico de la presente invención, es decir, están posicionados de manera que estimulan la transcripción del ARN mensajero a partir del ADN que codifica el receptor quimérico. El promotor puede ser de origen genómico o puede generarse sintéticamente. En la técnica son conocidos varios promotores para uso en células T (por ejemplo, LTR nativo de vector gamma retroviral, PGK y EF1), y en algunos casos los promotores son inducibles. El promotor puede ser constitutivo o inducible, donde la inducción está asociada con el tipo de célula específico o un nivel específico de maduración, por ejemplo. Alternativamente, también son adecuados varios promotores virales muy conocidos. Los promotores de interés incluyen el promotor de la β -actina, los promotores temprano y tardío de SV40, el promotor de inmunoglobulina, el promotor de citomegalovirus humano, promotor de retrovirus, y el promotor de del virus formador de foco esplénico de Friend. Los promotores pueden o no estar asociados con potenciadores, en donde los potenciadores pueden estar asociados naturalmente con el promotor particular o estar asociados con un promotor diferente.

La secuencia del marco de lectura abierto que codifica el receptor quimérico puede obtenerse de una fuente de ADN genómico, una fuente de ADNc, o puede sintetizarse (p. ej., mediante PCR), o combinaciones de los mismos. Dependiendo del tamaño del ADN genómico y del número de intrones, puede ser deseable usar ADNc o una combinación de los mismos, ya que se encuentra que los intrones estabilizan el ARNm o proporcionar expresión específica de células NKT. También, puede ser además ventajoso usar regiones no codificadoras endógenas o exógenas para estabilizar el ARNm.

Para la expresión de un receptor quimérico de la presente invención, la región de inicio transcripcional natural o endógena de la secuencia de ácido nucleico que codifica el componente N-terminal del receptor quimérico puede usarse para generar el receptor quimérico en el huésped diana. Alternativamente, puede usarse una región de inicio transcripcional exógena que permite la expresión constitutiva o inducible, en donde la expresión puede controlarse dependiendo del huésped diana, el nivel de expresión deseado, la naturaleza del huésped diana, y semejantes.

Asimismo, una secuencia señal que dirige al receptor quimérico a la membrana de la superficie puede ser la secuencia señal endógena del componente N-terminal del receptor quimérico. Opcionalmente, en algunos casos, puede ser deseable intercambiar esta secuencia por una secuencia señal diferente. Sin embargo, la secuencia señal seleccionada debe ser compatible con la ruta secretora de las células NKT de manera que el receptor quimérico se presente en la superficie de la célula NKT.

De forma similar, puede proporcionarse una región de terminación por la región de terminación transcripcional natural o endógena de la secuencia de ácido nucleico que codifica el componente C-terminal del receptor quimérico. Alternativamente, la región de terminación puede derivar de una fuente diferente. Para la mayor parte, la fuente de la región de terminación no se considera generalmente crítica para la expresión de una proteína recombinante y puede emplearse una amplia variedad de regiones de terminación son afectar adversamente la expresión.

Como apreciará un experto en la técnica, en algunos casos, pueden delecionarse unos pocos aminoácidos en los extremos del GD2, habitualmente no más de 10, más habitualmente no más de 5 residuos, por ejemplo. También, puede ser deseable introducir un pequeño número de aminoácidos en los extremos, habitualmente no más de 10, más habitualmente no más de 5 residuos. La delección o inserción de aminoácidos puede ser el resultado de las necesidades de la construcción, proporcionando sitios de restricción convenientes, facilidad de manipulación, mejora en los niveles de expresión, o semejantes. Además, la sustitución de uno o más aminoácidos con un aminoácido diferente puede ocurrir por razones similares, habitualmente no se sustituyen más de aproximadamente cinco aminoácidos en un dominio cualquiera.

La construcción quimérica que codifica el receptor quimérico según la invención puede prepararse de maneras convencionales. Porque, para la mayor parte, pueden emplearse secuencias naturales, los genes naturales pueden aislarse y manipularse, según sea apropiado, de manera que se permite la unión apropiada de los diferentes

componentes. Así, las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas N-terminales y C-terminales del receptor quimérico pueden aislarse mediante el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores apropiados que dan lugar a la delección de las partes no deseadas del gen. Alternativamente, los digeridos de restricción de los genes clonados pueden usarse para generar la construcción quimérica. En cualquier caso, las secuencias pueden seleccionarse para proporcionar sitios de restricción que son romos, o tienen protuberancias complementarias.

Las diferentes manipulaciones para preparar la construcción quimérica pueden llevarse a cabo *in vitro* y en realizaciones particulares la construcción quimérica se introduce en vectores para la clonación y expresión en un huésped apropiado usando métodos estándar de transformación o transfección. Así, después de cada manipulación, la construcción resultante de unir las secuencias de ADN se clona, el vector se aísla, y la secuencia se criba para asegurar que la secuencia codifica el receptor quimérico deseado. La secuencia puede cribarse por análisis de restricción, secuenciación, o semejantes.

Las construcciones quiméricas de la presente invención encuentran aplicaciones en sujetos que tienen o que se sospecha que tienen cáncer, mediante la reducción del tamaño de un tumor o la prevención del crecimiento o rec-recimiento de un tumor en estos sujetos. De acuerdo con esto, las realizaciones la presente invención se refieren además a un método para reducir el crecimiento o prevenir la formación de un tumor en un sujeto, mediante la introducción de una construcción quimérica de la presente invención en una célula NKT aislada del sujeto y la reintroducción en el sujeto de la célula NKT transformada, produciendo de esta manera respuestas antitumorales para reducir o eliminar los tumores en el sujeto. Como es muy conocido para un experto en la técnica, están fácilmente disponibles varios métodos para aislar estas células de un sujeto, por ejemplo, usando la expresión de marcadores de la superficie celular o usando kits disponibles comercialmente (p. ej., ISOCELL™ de Pierce, Rockford, IL).

Se contempla que la construcción quimérica puede introducirse en las propias células NKT del sujeto como ADN desnudo o en un vector adecuado. Los métodos para transfectar de forma estable células T por electroporación usando ADN desnudo son conocidos en la técnica. Véase, p. ej., la Pat. U.S. No. 6 410 319. El ADN desnudo se refiere generalmente al ADN que codifica un receptor quimérico de la presente invención contenido en un vector de expresión plasmídico en la orientación apropiada para la expresión. Ventajosamente, el uso de ADN desnudo reduce el tiempo requerido para producir células T que expresan el receptor quimérico de la presente invención.

Alternativamente, puede usarse un vector viral (p. ej., un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector viral adeno-asociado, o un vector lentiviral) para introducir la construcción quimérica en células NKT. Los vectores adecuados para uso según el método de la presente invención no se replican en las células NKT del sujeto. Se conoce un gran número de vectores que se basan en virus, donde el número de copias del virus mantenido en la célula es lo suficientemente bajo como para mantener la viabilidad de la célula. Los vectores ilustrativos incluyen los vectores pFB-neo (STRATAGENE®) descritos en la presente memoria, así como los vectores basados en VIH, SV40, EBV, HSV o pbV.

Una vez se establece que la célula NKT transfectada o transducida es capaz de expresar el receptor quimérico como una proteína de superficie de la membrana con la regulación deseada y a un nivel deseado, puede determinarse si el receptor quimérico es funcional en la célula huésped para proporcionar la inducción de la señal deseada. Posteriormente, las células NKT transducidas se reintroducen o administran al sujeto para activar respuestas antitumorales en el sujeto. Para facilitar la administración, las células NKT transducidas según la invención pueden prepararse en una composición farmacéutica o prepararse en implantes apropiados para la administración *in vivo*, con vehículos o diluyentes apropiados, que pueden ser además farmacéuticamente aceptables. Los medios para preparar dicha composición o un implante se han descrito en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed., Mack, ed. (1980)). Cuando sea apropiado, las células T transducidas pueden formularse en una preparación en forma semisólida o líquida, tal como una cápsula, disolución, inyección, inhalador, o aerosol, de las formas habituales para su ruta de administración respectiva. Pueden utilizarse medios conocidos en la técnica para prevenir o minimizar la liberación y absorción de la composición hasta que alcanza el tejido u órgano diana, o para asegurar la liberación controlada en el tiempo de la composición. De forma deseable, sin embargo, se emplea una forma farmacéuticamente aceptable que no inutilizan a las células que expresan el receptor quimérico. Así, de forma deseable, las células T transducidas pueden prepararse en una composición farmacéutica que contiene una disolución salina equilibrada, preferiblemente disolución salina equilibrada de Hanks, o disolución salina normal.

Una composición farmacéutica de la presente descripción puede usarse sola o en combinación con otros agentes bien establecidos útiles para tratar cáncer. Ya se administre sola o en combinación con otros agentes, la composición farmacéutica de la presente descripción puede administrarse a través de varias rutas y en varios sitios en un cuerpo de mamífero, particularmente humano, para conseguir un efecto particular. Un experto en la técnica reconocerá que, aunque puede usarse más de una ruta para la administración, una ruta particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta. Por ejemplo, la administración intradérmica puede usarse ventajosamente sobre la inhalación para el tratamiento de melanoma. La administración local o sistémica puede conseguirse por la administración que comprende la aplicación o instilación de la formulación en cavidades corporales, inhalación o insuflación de un aerosol, o por la introducción parenteral, que comprende administración intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peritoneal, subcutánea, o intradérmica.

Una composición de la presente descripción puede proporcionarse en forma de dosificación unitaria, en donde cada

unidad de dosificación, p. ej., una inyección, contiene una cantidad predeterminada de la composición, sola o en combinación apropiada con otros agentes activos. El término forma de dosificación unitaria, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición de la presente invención, sola o en combinación con otros agentes activos, calculada en una cantidad suficiente como para producir el efecto deseado, en asociación con un diluyente, transportador, o vehículo farmacéuticamente aceptable, cuando sea apropiado. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitaria de la presente invención dependen de la farmacodinámica particular asociada con la composición farmacéutica en el sujeto particular.

De forma deseable, una cantidad efectiva o número suficiente de células T transducidas aisladas está presente en la composición y se introduce en el sujeto de manera que se establecen respuestas antitumorales específicas a largo plazo para reducir el tamaño de un tumor o eliminar el crecimiento o recrecimiento tumoral que se produciría de otra forma en ausencia de dicho tratamiento. De forma deseable, la cantidad de células T transducidas reintroducida en el sujeto causa una disminución del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 100 % en el tamaño del tumor cuando se compara con las mismas condiciones, en donde no están presentes las células T transducidas.

De acuerdo con esto, la cantidad de células NKT transducidas administrada debería tener en cuenta la ruta de administración y debería ser tal que se introduzca un número suficiente de las células NKT transducidas, de manera que se logre la respuesta terapéutica deseada. Además, las cantidades de cada agente activo incluidas en las composiciones descritas en la presente memoria (p. ej., la cantidad por cada célula que se va a poner en contacto o la cantidad por un determinado peso corporal) puede variar en diferentes aplicaciones. En general, la concentración de células NKT transducidas, debería ser suficiente, de forma deseable, para proporcionar en el sujeto que se está tratando, al menos de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 células NKT transducidas, incluso de forma más deseable, de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 5×10^8 células T transducidas, aunque puede utilizarse cualquier cantidad adecuada bien por encima, p. ej., mayor de 5×10^8 células, o por debajo, p. ej., menor de 1×10^7 células. El esquema de dosificación puede estar basado en terapias basadas en células bien establecidas (véase, p. ej., Topalian y Rosenberg (1987) Acta Haematol. 78 Supl 1:75-6; Pat. U.S. No. 4 690 915) o puede emplearse una estrategia alternativa de infusión continua.

Estos valores proporcionan una guía general del rango de células NKT transducidas que se van a utilizar por el médico después de optimizar el método de la presente invención para la práctica de la invención. La indicación en la presente memoria de dichos rangos no evita, de ninguna manera, el uso de una cantidad mayor o menor de un componente, como podría requerirse en una aplicación particular. Por ejemplo, la dosis y esquema real puede variar dependiendo de si las composiciones se administran en combinación con otras composiciones farmacéuticas, o dependiendo de las diferencias interindividuales en farmacocinética, disposición del fármaco, y metabolismo. Un experto en la técnica puede realizar fácilmente cualquier ajuste necesario según las exigencias de la situación particular.

IV. Terapia de combinación

En determinadas realizaciones de la invención, los métodos de la presente invención para aspectos clínicos se combinan con otros agentes efectivos en el tratamiento de enfermedad hiperproliferativa, tal como agentes anticancerosos. Un agente "anticanceroso" es capaz de afectar negativamente a un cáncer en un sujeto, por ejemplo, matando células cancerosas, induciendo apoptosis en células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de las células cancerosas, reduciendo la incidencia o número de metástasis, reduciendo el tamaño tumoral, inhibiendo el crecimiento tumoral, reduciendo el suministro de sangre a un tumor o células cancerosas, estimulando una respuesta inmune frente a las células cancerosas o un tumor, previniendo o inhibiendo la progresión del cáncer, o incrementando la duración de la vida de un sujeto con cáncer. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarán en una cantidad combinada efectiva como para matar o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar poner en contacto las células cancerosas con la construcción de expresión y el o los agentes o múltiples factores al mismo tiempo. Esto puede conseguirse poniendo en contacto la célula con una única composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en donde una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye el o los segundos agentes.

La resistencia de las células tumorales a los agentes de quimioterapia y radioterapia representa un problema importante en la oncología clínica. Un objetivo de la investigación sobre el cáncer actual es encontrar formas de mejorar la eficacia de la quimio y radioterapia mediante su combinación con la terapia celular. En el contexto de la presente invención, se contempla que la terapia celular podría usarse de forma similar conjuntamente con la intervención quimioterapéutica, radioterapéutica, o inmunoterapéutica, por ejemplo.

La presente terapia inventiva puede preceder o seguir al tratamiento con el otro agente por intervalos que varían de minutos a semanas. En realizaciones donde el otro agente y la presente invención se aplican separadamente al individuo, se asegurará generalmente que no pasa un periodo de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de manera que el agente y la terapia inventiva todavía sean capaces de ejercer un efecto combinado ventajoso en la célula. En dichos casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula con ambas modalidades en aproximadamente 12-24 h una de otra y, más preferiblemente, en aproximadamente 6-12 h una de

otra. En algunas situaciones, puede ser deseable prolongar el periodo de tiempo para el tratamiento significativamente, sin embargo, con un lapso de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

5 Pueden emplearse varias combinaciones, la presente invención es "A" y el agente secundario, tal como radio o quimioterapia, es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

10 Se espera que los ciclos de tratamiento se repetirán según sea necesario. También se contempla que pueden aplicarse varias terapias estándar, así como intervención quirúrgica, en combinación con la terapia celular inventiva.

A. Quimioterapia

15 En algunas realizaciones, la invención se emplea con quimioterapia. Aunque la quimioterapia puede ser de cualquier clase, en realizaciones específicas, la quimioterapia es útil para el neuroblastoma. En realizaciones específicas, la quimioterapia comprende Adriamicina PFS (Hidrocloruro de Doxorrubicina); Adriamicina RDF (Hidrocloruro de Doxorrubicina); Clafen (Ciclofosfamida); Ciclofosfamida; Citoxán (Ciclofosfamida); Hidrocloruro de Doxorrubicina; Neosar (Ciclofosfamida); Vincasar PFS (Sulfato de Vincristina); y/o Sulfatos de Vincristina.

20 Las terapias para el cáncer también incluyen una variedad de terapias de combinación con tratamientos tanto químicos como basados en radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, por ejemplo, abraxano, altretamina, docetaxel, herceptina, metotrexato, novantrona, zoladex, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógenos, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier variante análoga o derivada de los anteriores.

25 B. Radioterapia

Otros factores que causan daño en el ADN y que se han usado extensamente incluyen lo que se conoce comúnmente como rayos γ , rayos X, y/o la administración dirigida de radioisótopos a células tumorales. Otras formas de factores dañinos para el ADN también se contemplan, tales como microondas e irradiación UV. Lo más probable es que todos estos factores produzcan un rango amplio de daño en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y

30 reparación del ADN, y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los rangos de dosificación para los rayos X varían de dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante periodos de tiempo prolongados (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los rangos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la vida media del isótopo, de la fuerza y tipo de la radiación emitida, y de la captación por las células neoplásicas.

35 Los términos "contactada" y "expuesta", cuando se aplican a una célula, se usan en la presente memoria para describir el proceso por el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se administran a una célula diana o se ponen en yuxtaposición directa con la célula diana. Para conseguir la muerte o estasis de las células, ambos agentes se administran a una célula en una cantidad combinada efectiva para matar la célula o prevenir que se divida.

40 C. Inmunoterapia

Los inmunoterapéuticos se basan generalmente en el uso de células efectoras inmunes y moléculas para tomar como diana y destruir las células cancerosas. El efector inmune puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de la terapia o puede reclutar a otras células para llevar a cabo realmente la muerte celular. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina pertussis, etc.) y servir

45 meramente como un agente de direccionamiento. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que porta una molécula de superficie que interacciona, bien directamente o indirectamente, con una célula tumoral diana. Varias células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK.

50 Así la inmunoterapia podría usarse como parte de una terapia combinada, conjuntamente con la presente terapia celular. La estrategia general para la terapia combinada se discute más adelante. Generalmente, la célula tumoral debe portar algún marcador que sea susceptible de ser tomado como diana, es decir, no está presente en la mayoría del resto de células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para ser tomado como diana en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de la próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa

(p97), gp68, TAG-72, HMFG, Antígeno Sialil Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógeno, receptor de laminina, erb B y p155.

D. Genes

5 En otra realización más, el tratamiento secundario es una terapia génica en la que un polinucleótido terapéutico se administra antes, después, o al mismo tiempo que las realizaciones clínicas de la presente invención. Una variedad de productos de expresión está englobada en la invención, incluyendo inductores de la proliferación celular, inhibidores de la proliferación celular, o reguladores de la muerte celular programada.

E. Cirugía

10 Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterán a cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento para el cáncer que puede usarse conjuntamente con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

15 La cirugía curativa incluye la resección en la que todo o parte del tejido canceroso se elimina, escinde, y/o destruye físicamente. La resección tumoral se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento por cirugía incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía, y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Se contempla además que la presente invención puede usarse conjuntamente con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres, o cantidades incidentales de tejido normal.

20 Después de la escisión de parte de todas las células, tejido, o tumor canceroso, puede formarse una cavidad en el cuerpo. El tratamiento puede conseguirse por perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia anticancerosa adicional. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4, y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses. Estos tratamientos también pueden consistir en dosificaciones variadas.

F. Otros agentes

25 Se contempla que pueden usarse otros agentes en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que producen la regulación al alza de receptores de la superficie celular y uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, o agentes que incrementan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a inductores apoptóticos. Los agentes inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral; interferón alfa, beta, y gamma; IL-2 y otras citoquinas; F42K y otros análogos de citoquinas; o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES, y otras quimioquinas. Se contempla además que la regulación al alza de receptores de la superficie celular o sus ligandos tales como Fas / ligando Fas, DR4 o DR5 / TRAIL potenciaría las capacidades inductoras de la apoptosis de la presente invención mediante el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino en las células hiperproliferativas. El incremento en la señalización intercelular mediante la elevación del número de uniones GAP incrementaría los efectos antihiperproliferativos en la población vecina de células hiperproliferativas. En otras realizaciones, los agentes citostáticos o de diferenciación pueden usarse en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Se contemplan los inhibidores de la adhesión celular para mejorar la eficacia de la presente invención. Los ejemplos de inhibidores de la adhesión celular son inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAK) y Lovastatina. Se contempla además que otros agentes que incrementan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tales como el anticuerpo c225, podrían usarse en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia del tratamiento.

V. Kits

45 Cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitativo, una construcción de expresión, uno o más reactivos para generar una construcción de expresión, células para la transfección de la construcción de expresión, y/o uno o más instrumentos para obtener células autólogas para la transfección de la construcción de expresión (dicho instrumento puede ser una jeringa, pipeta, fórceps, y/o cualquiera de los aparatos aprobados médicamente) puede proporcionarse en el kit. El kit también comprende uno o más agentes quimioterapéuticos, incluyendo uno o más agentes quimioterapéuticos para neuroblastoma, por ejemplo.

50 Los kits pueden comprender una o más composiciones alicuotadas adecuadamente de la presente invención o reactivos para generar composiciones de la invención. Los componentes de los kits pueden estar envasados bien en medio acuoso o en forma liofilizada. El medio contenedor de los kits puede incluir al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro medio contenedor, en el que puede ponerse un componente, y preferiblemente, alicuotado adecuadamente. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro contenedor adicional en los que pueden ponerse separadamente los componentes adicionales. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits también incluirán típicamente un medio para contener la construcción del receptor quimérico y cualesquiera otros contenedores de reactivos en confinamiento cerrado para la venta comercial. Dichos contenedores pueden incluir contenedores de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se retienen los viales deseados, por ejemplo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención. No deben considerarse, sin embargo, de ninguna manera como limitantes del alcance amplio de la invención.

5 Ejemplo 1

Los macrófagos asociados a tumores sofocan a las células NKT: un mecanismo de escape inmune y una diana para terapia

Las células T Asesinas Naturales (NKT) con Vα24 invariable inhiben el crecimiento tumoral tomando como diana los macrófagos asociados a tumores (TAM). La progresión tumoral requiere, por lo tanto, que los TAM evadan la actividad de las células NKT mediante un mecanismo todavía desconocido. En realizaciones, existe un subconjunto de células en líneas celulares de neuroblastoma (NB) y tumores primarios que expresan TNFα unido a membrana (mb). Estas células tumorales proinflamatorias inducen la producción de la quimioquina CCL20 de los TAM mediante la activación de la ruta de señalización NF-κB, un efecto que se amplifica en hipoxia. Los análisis por citometría de flujo de tumores de NB humanos primarios, revelaron la acumulación selectiva de CCL20 en TAM. La neutralización de la quimioquina inhibió la migración de los NKT *in vitro* hacia monocitos hipóxicos condicionados por el tumor y la localización *in vivo* a injertos de NB en ratones humanizados NOD/SCID/IL2rgamma(null) (hu-NSG). La hipoxia altera la viabilidad y función de las células NKT, de manera que el movimiento de las células NKT hacia TAM que producen CCL20 sirve como una trampa hipóxica para los NKT que se infiltran en tumores. IL-15 protegió a los NKT frente a la hipoxia, y la expresión transgénica de IL-15 en NKT transferidos de forma adoptiva aumentó dramáticamente su actividad antimetastásica comparado con NKT parentales en el modelo hu-NSG. Así, la producción de CCL20 inducida por el tumor en TAM hipóxicos y la quimioatracción e inhibición posterior de los NKT representa un nuevo mecanismo de escape inmune que puede revertirse por inmunoterapia adoptiva con NKT transducidos con IL-15.

Ejemplo 2

El contacto con células NB e hipoxia induce sinérgicamente CCL20 en monocitos humanos

Para explicar la colocalización observada de NKT con TAM en NB humano primario (Song *et al.*, 2009), se consideró que los TAM después de la influencia de las células tumorales y/o entorno hipóxico, quimioatraen activamente a los NKT. Para caracterizar adicionalmente esto, los inventores realizaron un experimento de migración *in vitro* usando pocillos de cámaras duales separados por una membrana con poros de 5 μm. Los NKT humanos expandidos *ex vivo* se añadieron a las cámaras superiores y se dejó que migraran durante 3 h a los pocillos inferiores, que contenían células de NB CHLA-255, monocitos humanos recién aislados (selección negativa) de sangre periférica, o una mezcla 1:1 de células de NB y monocitos. Antes de añadir los NKT, las placas con células de NB y monocitos se incubaron en condiciones normóxicas (20 % de O₂) o hipóxicas (1 % de O₂) durante 48 h. De forma consistente con observaciones previas, las células de NB fueron quimioatrayentes para los NKT en condiciones normóxicas (Metelitsa *et al.*, 2004). Sorprendentemente, la migración de las células NKT a células de NB se suprimió prácticamente en hipoxia (Fig. 1A). Por el contrario, la tasa de migración de las células NKT hacia el cocultivo de células de NB con monocitos se duplicó prácticamente en condiciones hipóxicas (P < 0.001) mientras los monocitos solos tuvieron poca actividad quimioatrayente tanto en normoxia como hipoxia. Estos datos sugieren que una interacción entre las células de NB y los monocitos bajo hipoxia da lugar a una inducción (regulación al alza) de la o las quimioquinas que quimioatraen a los NKT.

Para examinar el efecto global de la hipoxia en el perfil de expresión de genes de quimioquinas de las células de NB y monocitos, incubamos monocitos y células de NB CHLA-255 en condiciones normóxicas o hipóxicas durante 36 h seguido del aislamiento del ARN y RT-PCR cuantitativa para 11 genes de quimioquinas CC y CXC que se sabe que tienen receptores correspondientes en NKT humanos (Metelitsa *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2007). La Fig. 1B demuestra que la expresión de ARNm de CCL20, CCL5, CCL4, y CCL3 estaba regulada al alza mientras la de CCL2 estaba regulada a la baja en hipoxia comparado con normoxia (P<0.001). A diferencia de otras quimioquinas, CCL2 se expresa a altos niveles en células de NB y los experimentos adicionales con células de NB solas confirmaron que la hipoxia regula a la baja la expresión de CCL2 en células de NB tanto a los niveles de ARN como de proteína. Este descubrimiento explica la pérdida observada de quimioatracción de las células de NB para los NKT en hipoxia. Para examinar si la regulación al alza de la expresión del ARNm de CCL20, CCL5, CCL4, y CCL3 da lugar a una producción incrementada de las proteínas correspondientes, se analizaron los sobrenadantes de las mismas condiciones experimentales por ELISA y se encontró que solo la producción de CCL20 estaba regulada al alza significativamente en el cocultivo de monocitos con células de NB comparado con monocitos solos (las células de NB no producen CCL20 detectable). Además, el efecto del cocultivo en la regulación al alza de CCL20 se amplificó hasta 70 veces en condiciones hipóxicas comparado con condiciones normóxicas (P < 0.001, Fig. 1C). A pesar de la variabilidad observada en la magnitud de la producción de CCL20 por los monocitos de 13 individuos diferentes, la hipoxia la incrementó invariablemente en todos los casos. El análisis cinético demostró que la regulación al alza de CCL20 alcanzó un máximo después de 36 h de cocultivo en normoxia, pero continuó elevándose durante al menos 48 h en hipoxia (Fig.7A).

Para determinar sin ambigüedad la fuente celular de CCL20, cultivamos monocitos solos o con células de NB en condiciones normóxicas o hipóxicas y analizamos la acumulación intracelular de CCL20 por FACS usando tinción superficial para CD14 para discriminar monocitos de células de NB. La Fig. 1D demuestra que bien el contacto con células de NB o la hipoxia solo podría regular al alza la producción de CCL20 en monocitos. El mayor nivel de expresión de CCL20 se consiguió cuando los monocitos se cocultivaron con células de NB en hipoxia, lo que es consistente con los resultados del ELISA en la Fig. 1C. Las células de NB no expresaron CCL20 detectable en ninguna condición ensayada. Para examinar el requerimiento del contacto célula-célula entre los monocitos y las células de NB para la inducción de CCL20 en los monocitos, las células de NB se cultivaron con monocitos en los mismos pocillos o en los pocillos de cámara dual, separados por una membrana semipermeable de 400 nM. Los monocitos no produjeron CCL20 en ausencia de un contacto directo con las células de NB (Fig. 7C). Para determinar si la inducción de CCL20 en los monocitos que se observó en el sistema experimental *in vitro* descrito ocurría en el sitio tumoral en pacientes con NB, se realizó FACS en suspensiones celulares preparadas a partir de tumores de NB primarios recién reseccionados en el diagnóstico. Todas las células monocíticas derivadas del tumor expresaban CCL20, mientras las células tumorales y la mayoría de los leucocitos infiltrantes en tumor (TIL) CD45+ no monocíticos fueron negativos (Fig. 1E). Por lo tanto, los TAM en tumores de NB primarios producen CCL20, cuya expresión se induce selectivamente en células monocíticas después del contacto directo con células de NB y se aumenta por hipoxia.

Ejemplo 3

CCL20 se requiere para la migración de las células NKT hacia cultivo hipóxico de NB/monocitos y xenoinjertos de NB en ratones hu-NSG

Se ha reportado que CCL20 es una de las quimioquinas más potentes para los NKT humanos (Kim *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003). El análisis confirma que la mayoría de los NKT primarios de sangre periférica expresa CCR6, el único receptor para CCL20. Además, la expresión de CCR6 se conserva en NKT expandidos *ex vivo* (Fig. 8A). Para determinar el requerimiento del eje CCL20/CCR6 para la migración aumentada observada de NKT hacia el cocultivo de células de NB con monocitos en hipoxia (Fig. 1A), el estudio de migración *in vitro* se repitió en presencia de mAb neutralizantes de quimioquinas. De forma consistente con reportes previos, el mAb anti-CCL2 inhibió eficazmente la migración de las células NKT a NB o el cocultivo de NB+monocitos bajo normoxia (Metelitsa *et al.*, 2004), pero no bajo hipoxia. Solo el mAb neutralizante anti-CCL20 inhibió fuertemente la migración de las células NKT en hipoxia (Fig. 2A).

Para examinar la contribución relativa de CCL2 y CCL20 al mecanismo de la localización de las células NKT *in vivo* en el sitio tumoral, los inventores adaptaron un modelo de NB humano CHLA-255/luc previamente descrito en ratones inmunodeficientes (Song *et al.*, 2009) y en lugar de ratones NOD/SCID, usaron ratones hu-NSG (Fig. 9A). Como se ha observado por otros (Yahata *et al.*, 2002; Giassi *et al.*, 2008), los ratones hu-NSG tenían una reconstitución estable de células mielomonocíticas humanas, así como linfocitos B y T tres meses después del trasplante con células madre hematopoyéticas CD34+ de sangre del cordón humano (SCT, Fig. 9B,C). Las células de NB CHLA-255/luc se inyectaron bajo la cápsula renal tres meses y medio después de SCT. Como en los tejidos de NB humanos (Song *et al.*, 2009), los TAM representaron un subconjunto principal de leucocitos infiltrantes en el tumor (Fig. 9D,E) y se enriquecieron en un subconjunto con fenotipo M2 según se determina por la regulación a la baja de la expresión de HLA-DR comparado con los monocitos de sangre periférica CD14+ en los mismos ratones (Fig. 9F). De forma importante, las células HLA-DR^{bajo} CD14+ similares fueron el subconjunto dominante de TAM en tumores primarios de pacientes con NB (Fig. 9G). Tres semanas después de la inyección de las células de NB y de evidencia clara de crecimiento tumoral por imagen bioluminiscente, se inyectó a los ratones NKT humanos expandidos *ex-vivo* y se dividieron en grupos para recibir mAb neutralizante anti-CCL2 humano, anti-CCL20 humano o mAb de control de isotipo. Un grupo control no recibió NKT. En el día 3 después de la transferencia de las células NKT, los ratones se sacrificaron y se examinaron para la localización de las células NKT en los tejidos tumorales. Las Figs. 2B,C demuestran que los animales, tratados con mAb antiCCL2 o anti-CCL20, tenían una frecuencia más baja de NKT infiltrantes en el tumor entre los leucocitos hCD45+ infiltrantes en el tumor comparado con el grupo control de IgG (25.9 ± 12.6 % o 44.9 ± 6.3 % frente a 74.3 ± 9.7 %, respectivamente, P < 0.01, ANOVA de una vía). Mientras confirman el papel establecido previamente de CCL2 derivado de NB, estos datos establecen el requerimiento de CCL20 para la localización de las células NKT en el sitio tumoral, aunque la última quimioquina no se produce por las células tumorales, pero se induce en los TAM. Así, los NKT se localizan eficazmente en los tumores de NB en ratones hu-NSG y migran hacia los TAM de una manera dependiente de CCL20.

Ejemplo 4

TNFA mb en las células de NB induce la activación de NF-KB en monocitos que da lugar a la regulación al alza de CCL20

El requerimiento observado para un contacto célula-célula entre las células de NB y los monocitos para la inducción de CCL20 en monocitos y el requerimiento conocido de la activación de NF-kB para la expresión de CCL20 (Battaglia *et al.*, 2008) alentó una búsqueda de moléculas de la superficie celular candidatas en las células de NB con propiedades proinflamatorias. E. Goillot *et al* observaron la expresión de la proteína TNFα en dos líneas celulares de NB por inmunohistoquímica (Goillot *et al.*, 1992). Los inventores han examinado 3 líneas celulares de NB amplificadas para MYCN (SK-N-BE2, IMR32, LA-N1) y 3 no amplificadas para MYCN (CHLA-255, CHLA-15, LA-N-2) por FACS y

encontraron que la mayoría de las células en todas las líneas expresan TNF α intracelular (Fig. 19), así como en la superficie celular como una citoquina unida a membrana (mb) (Fig. 3A). El TNF α no soluble se ha detectado por ELISA en los sobrenadantes de todas las líneas celulares examinadas. De forma importante, la presencia de un subconjunto positivo para TNF α mb en los siete tumores de NB primarios examinados con la frecuencia variando del 1.1 % al 38.2 % (12.2 ± 14 %, Fig. 3B). El nivel de la expresión de MYCN no se correlacionó con la frecuencia de las células positivas para TNF α mb bien en líneas celulares o tumores primarios. Los experimentos de bloqueo de función demostraron que una preincubación de las células de NB con un mAb bloqueante anti-TNF α inhibió significativamente su capacidad de inducir la producción de CCL20 en monocitos tanto bajo condiciones normóxicas como hipóxicas ($P < 0.001$, Fig. 3C). Ni la frecuencia de las células positivas para TNF α ni el nivel de la expresión de TNF α en las células de NB se vio afectado por la hipoxia. Para examinar el requerimiento de TNF α mb para la activación de la señalización de NF- κ B en monocitos, los monocitos se cultivaron solos (en placas no adherentes) o en la monocapa de células de NB (los monocitos solo se adhieren débilmente a la monocapa de células de NB) en presencia de un mAb de control de isotipo o bloqueante anti-TNF α en condiciones normóxicas o hipóxicas. La Fig. 3D de muestra que I κ B α , un inhibidor de I κ B, se fosforila (un evento requerido aguas arriba de la activación de NF- κ B por estímulos extracelulares) en monocitos después del contacto con las células de NB y la fosforilación de I κ B α se previno casi completamente en presencia del mAb bloqueante anti-TNF α . La condición hipóxica aumentó la fosforilación de I κ B α y esto también fue inhibido fuertemente por el del mAb bloqueante anti-TNF α . Como las células de NB contaminantes no podían excluirse como una fuente de fosfo-I κ B α en las preparaciones de monocitos descritas anteriormente, repetimos este experimento y realizamos análisis por FACS intracelular de I κ B α y p65 fosforilado. Después de seleccionar células CD5610w (monocitos), hubo una disminución de la expresión de I κ B α (degradación después de fosforilación) en 30 min después del contacto con las células de NB, y el efecto se suprimió en presencia del mAb bloqueante anti-TNF α (Fig. 3E). De forma consistente con la disminución de la expresión de I κ B α , hubo un incremento en la expresión de fosfo-p65 en monocitos y esto se inhibió por el mAb bloqueante anti-TNF α en condiciones normóxicas Fig. 3F) e hipóxicas. El cocultivo de los monocitos con células de NB bajo hipoxia dio lugar a mayores niveles y una expresión más sostenida de p65 comparado con normoxia (Fig. 3G). Por lo tanto, NB contiene un subconjunto previamente desconocido de células tumorales proinflamatorias que expresan TNF α mb, que se requiere, al menos en parte, para la inducción de la producción de CCL20 en los TAM mediante la activación de la señalización de NF- κ B, que se estabiliza y aumenta por la hipoxia inducida por el tumor.

Las células NKT se localizan preferentemente en áreas hipóxicas en los tejidos tumorales. Para examinar la distribución relativa de los NKT en áreas hipóxicas y normóxicas del tumor, usamos un modelo metastásico de NB en ratones hu-NSG. En este modelo, se inyectaron células CHLA-255/luc intravenosamente para producir crecimiento metastásico en el hígado y hueso/médula ósea (Fig. 6A), que son también los sitios metastásicos principales en pacientes con NB (Seeger *et al.*, 1996). En el día 21, se inyectó a los ratones que portaban tumor NKT marcados con CFSE y su localización en las metástasis hepáticas se examinó 3 días después. Las áreas de hipoxia tanto en sitios primarios como metastásicos se visualizaron usando inyección intravital de EF5 seguido de tinción con mAb anti-EF5 conjugado con fluorocromo (Gacciabene *et al.*, 2011). Los mismos tejidos se cotifieron con mAb anti-CD11b, de manera que la distribución tanto de NKT como de células mieloides en tejidos tumorales normóxicos e hipóxicos se analizó y cuantificó usando microscopía confocal de 4 colores. A diferencia de los tejidos hepáticos normales en ratones hu-NSG sin tumor, en los que no se detectó tinción para hipoxia, los tejidos metastásicos contenían tanto áreas normóxicas como hipóxicas, y más del 90 % de los NKT y células mielomonocíticas se encontraron en las últimas. El análisis cuantitativo demostró que las frecuencias de células NKT y CD11b+ por 1000 células eran 14.8 ± 6.3 y 20.8 ± 8.9 frente a 1.3 ± 1.6 y 1.1 ± 1.2 en áreas hipóxicas frente a normóxicas, respectivamente ($P < 0.001$). Por lo tanto, los NKT se colocan con los TAM en los tejidos tumorales hipóxicos.

Ejemplo 5

Las células NKT se inhiben por contacto con células de NB e hipoxia

Como la muerte mediada por las células NKT o la inhibición de los TAM es importante para su actividad antitumoral frente a tumores negativos para CD1 d (Song *et al.*, 2009), se consideró cómo el entorno tumoral hipóxico que es responsable, al menos en parte, del movimiento de las células NKT hacia los TAM, afecta su viabilidad y función. Los NKT expandidos a partir de PBMC de cuatro donantes usando estimulación antigénica con α GalCer_ se cultivaron en condiciones normóxicas e hipóxicas durante 24 h y la viabilidad de las células NKT se examinó por exclusión de azul de tripán a diferentes intervalos de tiempo. En ausencia de citoquinas exógenas, la viabilidad de las células NKT se mantuvo durante 24 hr en normoxia, pero más del 50 % de las células murió en hipoxia durante el mismo periodo. La Fig. 4A demuestra que IL-2 y otras citoquinas que comparten la cadena gamma común (IL-15, IL-4, IL-7) excepto IL-21 mejoraron significativamente la supervivencia de las células NKT en hipoxia ($P < 0.01$). Aunque ambas citoquinas redujeron significativamente la tasa de apoptosis de las células NKT en normoxia, ni IL-2 ni IL-15 protegieron significativamente a los NKT de apoptosis en condiciones de hipoxia ($P > 0.05$), según se mide por tinción de Anexina-V/7-AAD (Fig. 20), lo que sugiere que el efecto observado en el número absoluto de células viables se debió en gran medida a la proliferación de las células NKT soportada por citoquinas como se muestra para NKT transducidos con IL-15 en la Fig. 6B y es consistente con el interruptor metabólico de linfocitos proliferantes a glicolisis con una dependencia reducida de oxígeno (Roos y Loos, 1973; Krauss *et al.*, 2001; Frauwirth *et al.*, 2002; Jones y Thompson, 2007).

Para examinar el efecto de la hipoxia en la actividad funcional de los NKT, los inventores activaron el TCR de las

células NKT mediante la adición del mAb agonista 6B11 y midieron la producción de citoquinas en los sobrenadantes celulares por ELISA. La Fig. 4B demuestra que, después de una exposición de 24 hr a hipoxia, la producción de IFN γ por los NKT cae hasta 31.9 ± 6.1 % y 25.7 ± 2.7 % de la cantidad producida en normoxia cuando los NKT se cultivaron solos o con células de NB, respectivamente ($P < 0.001$). Para examinar el potencial de la familia de citoquinas IL-2R γ para proteger la función de las células NKT frente a la hipoxia, los inventores añadieron concentraciones saturantes de estas citoquinas a cultivos de células NKT. IL-2 e IL-15 pero no tras citoquinas rescataron la respuesta de IFN γ de los NKT a la estimulación de TCR en ausencia o presencia de células de NB. Por lo tanto, la quimioatracción mediada por CCL20 de los NKT hacia TAM hipóxicos da lugar a la inhibición de la actividad funcional de las células NKT y el escape tumoral del control de las células NKT que pudo revertirse por IL-2 o IL-15, en determinadas realizaciones de la invención.

Varios reportes recientes demostraron que los NKT juegan un papel clave en el daño por reperusión en isquemia de hígado y riñón (Lappas *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007) y en la génesis de la crisis vaso-oclusiva en la enfermedad de las células estrelladas (Wallace *et al.*, 2009; Wallace y Linden, 2010; Field *et al.*, 2011). La isquemia e inflamación aguda en estas afecciones se han asociado con la producción espontánea de IFN γ por los NKT tanto en ratones como en seres humanos. Sin embargo, el efecto directo de la hipoxia en la expresión de IFN γ en los NKT no se ha evaluado. Para examinar el efecto de la hipoxia en la producción espontánea de citoquinas por los NKT humanos, cultivamos NKT quiescentes de cuatro donantes en condiciones normóxicas o hipóxicas durante diferentes intervalos de tiempo (2, 4, 6, 12, 24, y 48 h) y medimos la producción de IFN γ e IL-4 por ELISA. En ausencia de estimulación antigénica, las citoquinas permanecieron indetectables en normoxia o hipoxia a cualquier intervalo de tiempo examinado, lo que sugiere que la hipoxia no estimula directamente los NKT humanos.

Ejemplo 6

IL-15 protege a los NKT y restaura su potencial antitumoral

IL-15 juega un papel crítico en el desarrollo y mantenimientos homeostático de las células NKT (30;31). Los resultados de este estudio (Fig. 4B) sugieren que IL-15 también puede proteger a los NKT del efecto inhibitorio de microentorno tumoral hipóxico. Por lo tanto, en realizaciones de la invención, la expresión transgénica de IL-15 en NKT transferidos de forma adoptiva aumentaría su potencial antitumoral debido a una persistencia y funcionalidad *in vivo* mejoradas en el sitio del tumor. Los NKT se transdujeron con una construcción retroviral previamente descrita, que contenía ADNC de IL-15 humano, gen suicida de caspasa-9 inducible (iCasp-9), y etiqueta CD34 (Hsu *et al.*, 2007) para crear NKT/IL-15. La Fig. 5A muestra que los NKT humanos expandidos ex-vivo podían transducirse de forma estable con el vector que contenía IL-15. Producción de IL-15 por los NKT transducidos por ELISA. Para examinar el potencial protector de IL-15 transgénico sobre la función de las células NKT bajo hipoxia y en presencia de células tumorales, se usaron ajustes similares *in vitro* como se describe en la Fig. 4B y se midió la proliferación de las células NKT inducida por TCR usando el ensayo de dilución CFSE. De forma consistente con las propiedades protectoras observadas de hrIL-15 exógeno, los NKT/IL-15 tenían una tasa de proliferación significativamente más alta en hipoxia solas y en presencia de células de NB comparado con NKT parentales (Fig. 5B, $P < 0.01$). El efecto antiapoptótico de IL-15 transgénico fue significativo solo en condiciones normóxicas, como lo fue el efecto antiapoptótico de IL15 exógeno (Fig. 20). El recuento celular absoluto al final del cultivo de 5 días, demostró de forma conclusiva que los NKT/IL-15 se expandieron significativamente mejor que los NKT en todas las condiciones ensayadas (Fig. 6C). Por lo tanto, los NKT preparados por ingeniería para expresar IL-15 transgénico están protegidos después del reconocimiento antigénico en el microentorno tumoral hipóxico.

Ejemplo 7

Las NKT transducidas con IL-15 tienen una actividad antitumoral potente en un modelo de NB metastásico en ratones hu-NSG

Para examinar si los NKT/IL-15 tienen una ventaja terapéutica, se utilizó un modelo de NB metastásico en ratones hu-NSG. Tres meses y medio después de SCT y después de la confirmación de la reconstitución hematopoyética humana (Fig. 9B,C), se inyectó i/v a los ratones células de NB humanas transducidas con luciferasa, CHLA-255/luc. Los grupos terapéuticos también recibieron una única inyección bien de NKT o NKT/IL15. Los ratones NSG que no recibieron células madre humanas CD34+ se usaron como un grupo control para evaluar el efecto global de las células hematopoyéticas humanas en el crecimiento tumoral. La Fig. 6A demuestra que el crecimiento metastásico en ratones hu-NSG se aumentó dramáticamente comparado con ratones NSG, proporcionando un apoyo adicional para el papel prominente de las células derivadas de BM en el aumento del crecimiento del NB. La inmunoterapia con los NKT tuvo un efecto inhibitorio significativo pero corto en el crecimiento metastásico. Por el contrario, una única inyección de NKT/IL-15 suprimió completamente el efecto promotor sobre el tumor del entorno hematopoyético humano (Fig. 6A,B). Para determinar si la actividad antitumoral aumentada de los NKT/IL-15 permanece restringida a CD1d, los inventores repitieron el tratamiento de metástasis de NB en ratones hu-NSG con NKT/IL-15 después de pretratamiento con mAb bloqueante anti-CD1d o de control de isotipo. La Fig. 6C demuestra que la eficacia antitumoral de NKT/IL-15 se inhibió con el mAb anti-CD1d ($P < 0.05$), indicando que el efecto de IL-15 depende, al menos en parte, de la función de los NKT restringidos a CD1d aunque, debido a una inhibición incompleta, no puede excluirse una contribución de efectos independientes de NKT de IL-15, tales como activación de las células NK. Estos datos indican que la inmunoterapia con NKT/IL-15 puede ser efectiva en pacientes con NB metastásico y otros tipos de cáncer. Esta nueva forma de

inmunoterapia que tiene como diana el estroma que soporta el tumor puede combinarse con otras formas de inmunoterapia o quimioterapia que tienen como diana las células tumorales directamente, en determinadas realizaciones de la invención.

Ejemplo 8

5 Significancia de determinadas realizaciones

El contenido de materia en la presente memoria revela un nuevo mecanismo de escape tumoral del control inmune por NKT y proporciona la información mecanística en el desarrollo de inmunoterapia para el cáncer basada en células NKT. Como la actividad antitumoral de las células NKT frente a tumores negativos para CD1 d depende de su capacidad documentada de colocarse e interactuar con TAM CD1d+ (Song *et al.*, 2009), la elucidación del mecanismo por el que los NKT se mueven hacia los TAM y la comprensión del efecto de este proceso en la función de las células NKT son útiles para el diseño racional de inmunoterapia basada en células NKT. Además del requerimiento descrito previamente para CCL-2 derivado de células de NB (Metelitsa *et al.*, 2004), la migración de las células NKT al sitio tumoral depende de CCL20, que se produce por los TAM en el interior de los tejidos tumorales. La expresión de CCL20 se induce en células monocíticas después del contacto con células de NB y depende, al menos en parte, de TNF α mb, que se expresa en la superficie de las células de NB. Además, la expresión de CCL20 inducida por las células de NB en células monocíticas está muy amplificada por la hipoxia, que se sabe que atrae TAM (Mantovani *et al.*, 2008; Allavena *et al.*, 2008; Mantovani *et al.*, 2006). Esto indica que un gradiente de CCL20 dirige el movimiento de las células NKT hacia los tejidos tumorales hipóxicos. De hecho, más del 90 % de los NKT infiltrantes en tumor se colocan con macrófagos en áreas hipóxicas de xenoinjertos de NB en ratones hu-NSG. La hipoxia, a su vez, inhibe la capacidad de las células NKT para responder a una estimulación antigénica que explica cómo los tumores en crecimiento pueden neutralizar la función de las células NKT y rescatar los TAM que soportan el tumor del ataque de las células NKT. De forma importante, IL15 protege a los NKT activados por antígeno frente a la hipoxia y los NKT/IL-15 tienen una actividad antitumoral potente y duradera en un modelo de NB metastásico en hu-NSG.

Los TAM en tumores de NB primarios producen CCL20, cuya expresión se induce selectivamente en células monocíticas después del contacto directo con células de NB y se aumenta por la hipoxia. Es interesante el hecho de que hay un requerimiento diferencial para CCL2 y CCL20 para la migración de las células NKT *in vitro* hacia un cocultivo de células de NB con monocitos en condiciones normóxicas e hipóxicas. Aunque CCL2 se requirió para la migración de las células NKT en normoxia, CCL20 fue en gran medida responsable de su migración en hipoxia. La regulación a la baja observada de la expresión de CCL2 en células de NB bajo hipoxia combinada con la inducción de CCL20 en monocitos hipóxicos, sugiere un modo en dos etapas de la migración de las células NKT en los tejidos tumorales: la salida mediada por CCR2 o CCR4 de la circulación hacia células de NB productoras de CCL2 en las áreas oxigenadas alrededor de los vasos sanguíneos y después el movimiento mediado por CCR6 hacia los TAM productores de CCL20 en las áreas hipóxicas. Los experimentos de bloqueo *in vivo* con mAb neutralizante anti-CCL20 apoyan adicionalmente la importancia de CCL20 para la localización de las células NKT en el sitio tumoral. Por lo tanto, en realizaciones de la invención, los NKT se colocan con los TAM como parte de una nueva respuesta innata a la hipoxia inducida por el tumor. Dicha respuesta podría permitir la toma como diana mediada por las células NKT de los TAM en los estadios tempranos de la progresión tumoral cuando los TAM juegan un papel importante en la vascularización tumoral y la supervivencia de las células tumorales (Mantovani *et al.*, 2008; Sica *et al.*, 2008; Sica y Bronte, 2007; Pietras *et al.*, 2009). Además, este mecanismo es parte de un papel conservado evolutivamente de los NKT en la regulación negativa de la inflamación crónica, en determinadas realizaciones, y explica las capacidades paradójicas de estas células para controlar la autoinmunidad mientras estimulan la inmunidad tumoral, en realizaciones específicas. Sin embargo, el tumor en crecimiento también puede usar el mismo fenómeno para el escape inmune mediante el atrapamiento de los NKT en los tejidos hipóxicos y desactivando su función. Estos dos procesos con efectos opuestos en el crecimiento tumoral, ocurren probablemente al mismo tiempo, y el equilibrio entre ellos puede determinar el resultado de la enfermedad, en realizaciones particulares. Los inventores buscaron la señal inflamatoria iniciadora que desencadena la inducción de la expresión de CCL20 en monocitos después de su contacto con células tumorales ha identificado una expresión abundante de TNF α mb en la superficie celular en todas las líneas celulares de NB ensayadas, independientemente de su estado de MYCN y la existencia de un subconjunto de células de NB TNF α mb+ previamente desconocido en los tumores primarios. En la presente memoria se demuestra por primera vez que las células de NB tienen propiedades proinflamatorias potentes ya que, de una manera dependiente de TNF α , activan la ruta de señalización de NF- κ B en células monocíticas que da lugar no solo a la expresión de CCL20, sino también a la activación de un programa de expresión génica definido, que se sabe que es una característica de la inflamación crónica promotora de tumor (Pikarsky *et al.*, 2004; Greten *et al.*, 2004). Por ejemplo, NF- κ B activa la expresión del gen de IL-6 en células monocíticas, un factor de crecimiento conocido para células de NB con MYCN no amplificado, y el nivel de expresión del ARNm de IL-6 se correlaciona negativamente con la supervivencia sin enfermedad a largo plazo en pacientes con NB de alto riesgo (Song *et al.*, 2009). El papel promotor de tumor del eje TNF α -NF- κ B está bien descrito en tumores epiteliales tanto en modelos de cáncer en ratón como en pacientes con cáncer (Grivennikov *et al.*, 2010; Greten *et al.*, 2004; Szlosarek *et al.*, 2006; Affara y Coussens, 2007). Estos son tumores comunes en adultos que pueden estar frecuentemente etiológicamente o patogenéticamente ligados a las afecciones inflamatorias crónicas preexistentes tales como hepatitis (Pikarsky *et al.*, 2004) o colitis (Greten *et al.*, 2004). Por el contrario, NB, así como otros tumores pediátricos, surge durante la embriogénesis o desarrollo postnatal temprano en ausencia de una inflamación crónica preexistente (Maris *et al.*, 2007). La identificación de un subconjunto de células de NB en tumores primarios con altos niveles de TNF α mb indica que estas células inician la inflamación

de soporte del tumor y son útiles para ser una diana de la terapia con antagonistas de TNF α , tales como los que se están ensayando actualmente en ensayos clínicos en adultos con cánceres epiteliales y malignidades hematológicas (Szlosarek y Balkwill, 2003; Brown *et al.*, 2008; Friedberg *et al.*, 2008), por ejemplo.

La viabilidad y función de las células NKT están afectadas por la hipoxia, pero podrían protegerse por IL-2 o IL-15. Los estudios en ratones han demostrado que el desarrollo y mantenimiento homeostático de las células NKT dependen en gran medida de IL-15 (Matsuda *et al.*, 2002). IL-15 también estimula la proliferación y aumenta la supervivencia de los NKT humanos (Baev *et al.*, 2004). Los NKT humanos negativos para CD4 (en su mayor parte doble negativos para CD8/CD4, DN) expresan niveles mucho mayores de IL-2R α que el subconjunto CD4 $^{+}$, de manera que IL-15 expande preferentemente NKT DN (Baev *et al.*, 2004). De forma importante, los NKT DN son más citotóxicos que los NKT CD4 $^{+}$, y un reporte reciente demostró que solo se requieren los NKT DN para las respuestas antitumorales *in vivo* (Crowe *et al.*, 2005). Esto sugiere que la expresión de IL-15 en NKT para propósitos terapéuticos soportaría la expansión, persistencia, y actividad antitumoral de los NKT DN en pacientes con cáncer. La transducción de NKT con ADNc de IL-15 los protege de los efectos inhibidores de las células de NB y la hipoxia. De forma importante, los NKT/IL-15 demostraron una actividad terapéutica potente frente a metástasis de NB en ratones hu-NSG. Además de actuar directamente sobre los NKT y aumentar su actividad frente a los TAM, el IL-15 producido localmente se espera que active otras células efectoras inmunes antitumorales tales como NK y células T CD8 específicas de tumor (Walkdmann, 2006). Para asegurar la seguridad del uso clínico potencial de los NKT/IL-15, se incorporó un gen suicida, iCasp-9, que permite la eliminación de las células transgénicas después de su activación farmacológica con un fármaco molecular pequeño no tóxico, AP20187 (Straathof *et al.*, 2005; Tey *et al.*, 2007; Quintarelli *et al.*, 2007). Las células T que expresan la molécula iCasp-9 se eliminan eficazmente después de la activación farmacológica del gen suicida tanto *in vitro* como *in vivo* (Tey *et al.*, 2007; Quintarelli *et al.*, 2007), no solo en un modelo de ratón sino también en pacientes con linfoma. Por lo tanto, la terapia con NKT/IL-15 bajo el control de iCasp-9 se espera que sea segura y es necesario ensayarla en pacientes con NB recurrente/resistente.

En la presente memoria se identifica el mecanismo por el que los NKT son atraídos hacia los TAM en tejidos tumorales. En realizaciones de la invención, este mecanismo refleja un papel más amplio de los NKT en la regulación de la inflamación y es aplicable no solo en el contexto de la inflamación asociada a tumor, sino también en enfermedades crónicas infecciosas y autoinmunes, por ejemplo. El permitir la localización en el tumor y actividad funcional en el sitio del tumor de las células NKT mediante la modulación farmacológica y/o preparación por ingeniería de los NKT como se demuestra en la presente memoria da lugar al desarrollo de una inmunoterapia para el cáncer efectiva y ampliamente aplicable.

Ejemplo 9

Materiales y métodos ejemplares

Especímenes humanos. Se obtuvieron siete especímenes de NB primarios a partir de cirugía de biopsia en el diagnóstico en el Texas Childrens Cancer Center, Baylor College of Medicine según los protocolos aprobados por IRB H-26691 y H-6650. Para el análisis por FACS, los tejidos se homogeneizaron y se digirieron con dispasa II (Roche), colagenasa (Sigma) y ADNasa I en suspensiones de células individuales. Los tejidos remanentes se incluyeron en OCT y se mantuvieron a -80 °C. La sangre del cordón se obtuvo de un banco de sangre de cordón en el MD Anderson Cancer Center bajo el protocolo aprobado por IRB H-20911. Se obtuvo el consentimiento informado según las políticas del comité de revisión institucional y los procedimientos para investigación que tratan de especímenes humanos.

Líneas celulares. Las líneas celulares de NB CHLA-15, CHLA-255, CHLA-255/luc, LA-N-1, LA-N-2, SK-N-BE(2), e IMR32 se establecieron y mantuvieron como se ha descrito previamente (8;25;47). Las células 293T se adquirieron en ATCC y se mantuvieron en IMOM 10 % de FBS (Hyclone), y 2 mM GlutaMAX-1 (Gibco-BRL).

Producción de plásmidos y retrovirus. Se construyeron dos vectores retrovirales SFG, SFG.iCasp-9.2A..6.C034.2A.IL-15 y SFG.eGFP.FFluc, como se ha descrito previamente (32) y se usaron para transducir NKT. Para producir sobrenadantes retrovirales, se cotransfectaron células T 293 con 3 plásmidos (Peg-Pam-e que codifica gag-pol, ORF que codifica la cubierta viral ROF114 y la construcción retroviral) usando el reactivo de transfección Genejuice (Merck KGaA) y los sobrenadantes virales se recogieron 48 y 72 h después.

Aislamiento del ARN y RT-PCR en tiempo real. El ARN total de los sedimentos celulares se aisló usando TRIzol (Invitrogen). La calidad del ARN se evaluó por electroforesis en gel antes de la transcripción inversa en ADNc usando la transcriptasa inversa M-MLV con cebado con oligo dT (Invitrogen). La qRT-PCR se realizó con ensayo de supermezcla iQTM Sybr Green usando el sistema de detección de PCR en tiempo real multicolor iCycler iQTM (Bio-Rad). Los cebadores se adquirieron en Sigma (Tabla 1).

Tabla 1 Cebadores ejemplares de PCR en tiempo real

Gen	Secuencia de cebador directo (5'-3')	Secuencia de cebador inverso (5'-3')	Longitud
LAPTM5	GGTCACACCTCTGAGTATG (SEQ ID NO:1)	GTGGAGGAGAAGAGAACTC (SEQ ID NO:13)	128 pb
CCL3	TGGCTGCTCGTCTCAAAGTA (SEQ ID NO:2)	TGCAACCAGTTCTCTGCATC (SEQ ID NO:14)	116 pb
CCL20	CGTGTGAAGCCCACAATAA A (SEQ ID NO:3)	GCTGCTTTGATGTCAGTGCT (SEQ ID NO:15)	122 pb
CXCL12A	CAGAGCTGGGCTCCTACTGT (SEQ ID NO:4)	GCATTGACCCGAAGCTAAAG (SEQ ID NO:16)	117 pb
CXCL10	GCAGGTACAGCGTACGGTT C (SEQ ID NO:5)	CAGCAGAGGAACCTCCAGTC (SEQ ID NO:17)	124 pb
CCL17	TGGAGCAGTCCTCAGATGT C (SEQ ID NO:6)	CTTCTCTGCAGCACATCCAC (SEQ ID NO:18)	1 129 pb
CCL19	CATCATTGGTGCCACTCAGA (SEQ ID NO:7)	ACACAGATCCTGCACACACC (SEQ ID NO:19)	148 pb
CXCL11	ATGCAAAGACAGCGTCCTC T (SEQ ID NO:8)	CAAACATGAGTGTGAAGGGC (SEQ ID NO:20)	103 pb
CXCL16	CAATCCCCGAGTAAGCATG T (SEQ ID NO:9)	CTACACGAGGTTCCAGCTCC (SEQ ID NO:21)	119 pb
CCL5	TGTACTCCCGAACCCATTTC (SEQ ID NO:10)	TACACCAGTGGCAAGTGCTC (SEQ ID NO:22)	100 pb
CCL4	GGATTCACTGGGATCAGCA C (SEQ ID NO:11)	CTTCCTCGCAACTTTGTGGT (SEQ ID NO:23)	114 pb
CCL2	AGGTGACTGGGGCATTGAT (SEQ ID NO:12)	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC (SEQ ID NO:24)	109 pb

El cambio relativo en la expresión génica se calculó sobre la base del método ΔC_t usando el gen constitutivo LAPTM5 (proteína transmembrana asociada a lisosoma 5) como el control.

- 5 Expansión, cultivo y transducción de células NKT. Las líneas celulares de NKT se expandieron a partir de PBMC de voluntarios sanos como se ha descrito previamente con modificaciones (Metelitsa *et al.*, 2004). Brevemente, las PBMC se aislaron de capas leuco-plaquetarias por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Los NKT se purificaron con microlechos anti-iNKT (Miltenyi Biotec). La fracción negativa para PBMC se irradió (4000 Rad) y se dividió en partes alícuotas. Los NKT se estimularon con una parte alícuota de PBMC autólogas pulsadas con α -galactosilceramida (100 ng/mL, Funakoshi Co.Ltd). Se añadió rhIL-2 (200 U/ml, BOP, National Cancer Institute Frederick) al segundo día y después en días alternos. Los NKT se reestimularon cada dos semanas con las partes alícuotas remanentes de PBMC. El fenotipo y pureza de los NKT se evaluaron usando mAb para CD3, V α 24-J α 18 (6B11), y CD4. Los NKT proliferantes se transdujeron con sobrenadantes retrovirales en el día 5 después de la reestimulación en placas de 24 pocillos no tratadas con cultivo pre-recubiertas con fragmento de fibronectina recombinante (FN CH-296; Retronectina, Takara Shuzo). La tasa de transducción de las células NKT se midió por FACS con mAb anti-CD34-PE. Los NKT transducidos continuaron entonces su expansión en presencia de rhIL-2.

- 10 Los NKT sin estimular (7-10 días después de la reestimulación) se cultivaron bajo condiciones normóxicas (20 % de O₂) o hipóxicas (1 % de O₂ en un incubador Hearcell 240i tri-gas, Thermo Scientific) durante 24 o 48 h en ausencia o presencia de una de las siguientes citoquinas: rhIL-2 (NIH), IL-15, IL-4, IL-7 (10 ng/ml cada uno, Peprotech), o IL-21 (eBiosciences) a 200 U/ml cada uno. El número absoluto de células viables se cuantificó por el método de exclusión de azul de tripán.

Aislamiento de monocitos, experimentos de cocultivo. Las PBMC se aislaron por centrifugación en gradiente a partir de capas leuco-plaquetarias adquiridos de Gulf Coast Regional Blood Center (Houston, TX). Los monocitos se aislaron

por selección negativa usando el kit de Aislamiento de Monocitos II (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. En los experimentos de cocultivo, los monocitos se añadieron directamente a células de neuroblastoma o a los insertos separados por una membrana de 0.4 μm (Costar Corning) de células de neuroblastoma. Cuando se indica, las células de neuroblastoma se preincubaron con anticuerpo neutralizante de TNF α (1825, R&D Systems) o IgG1 de control de isotipo (11711, R&D Systems) durante 1 h antes del cocultivo con monocitos. Las células se cultivaron entonces en condiciones hipóxicas (1 % de O₂) o normóxicas (20 % de O₂) y se recogieron los sobrenadantes a los puntos de tiempo indicados.

Ensayo de cuantificación de citoquinas multiplex y ELISA. Las citoquinas liberadas por los NKT se evaluaron con lechos CBAPlex (BD Biosciences) en un analizador FACSArray según el manual del fabricante y como se ha descrito previamente (Metelitsa *et al.*, 2004). Se determinó CCL20 en los sobrenadantes del cocultivo usando el Kit de ELISA de CCL20/MIP-3 alfa Humano Quantikine (R&D Systems).

Ensayo de migración *in vitro*. La migración de las células NKT *in vitro* se evaluó usando insertos Transwell permeables (5 μm , Corning Costar). Cuando se indica, los sobrenadantes de monocitos y células de NB en las cámaras inferiores se preincubaron con anticuerpo de control de isotipo (clon 11711) o neutralizante frente a CCL20 (67310) o CCL2 (24822) (R&D Systems) durante 1 hr antes de añadir NKT en las cámaras superiores. El análisis cuantitativo de la migración de las células NKT se realizó por FACS como se ha descrito previamente (Song *et al.*, 2007).

Citometría de flujo (FACS). Para analizar la expresión de CCL20 en monocitos, las células se incubaron en primer lugar con GolgiStop (BO Biosciences) durante 4 h y después se tiñeron con los siguientes marcadores de superficie: CD56-APC, CD14-APC, Cy7, CD33-PE-Cy7 y CD45-PerCP (BO Biosciences). Las células se fijaron entonces y se permeabilizaron con un Kit Perm/Fix (BO Biosciences) y se tiñeron intracelularmente con CCL20-PE (BO Biosciences). Para determinar el nivel de la expresión de CCR6 en NKT, las células se tiñeron en superficie con CD3-APC, 6B11-FITC, CD4-(PE-Cy7), y CCR6-PE (BO Biosciences).

Para monitorizar el desarrollo de la hematopoyesis humana en los ratones hu-NSG, se utilizó el siguiente conjunto de mAb: anti-CD45 humano-FITC, anti-CD45 de ratón-PerCP, CD14-PE, CD33-PE-Cy7, CD3-APC (BO Biosciences) y CD20-APC-Cy7 (Biolegend). Para determinar la pureza de las células madre CD34⁺ humanas, los inventores usaron CD45-PerCP, CD3-APC y CD34-PE (BO Biosciences). Para analizar los leucocitos humanos que se infiltraban en neuroblastomas primarios o xenoinjertos de tumor en ratones hu-NSG: CD45-PerCP, CD3-APC, 6B11-FITC, CD14-APC-Cy7, HLADR-PE-Cy7, CD1d PE (BO Biosciences). Adicionalmente, los neuroblastomas primarios se analizaron para determinar la expresión de marcadores superficiales usando los mAb: CD45-PerCP, CD56-APC (BO Biosciences) y TNF α -FITC (R&D Systems).

Para determinar la proliferación de las células NKT, las células se marcaron en primer lugar con CFSE (Invitrogen) y después se reestimularon con el mAb agonista anti-TCR (6B11 o OKT3) seguido de un cultivo de 5 días con/sin células de NB en condiciones hipóxicas o normóxicas. Las células se tiñeron entonces en superficie con los mAb 6B11-PE y CD3-APC y se analizaron por citometría de flujo para determinar la dilución de CFSE en las células CD3⁺6B11⁺.

Los niveles de expresión de I κ B α y NF- κ B p65 fosforilado se determinaron por FACS en monocitos según los protocolos del fabricante (BD PhosFlow). Brevemente, se cultivaron 1-2 $\times 10^6$ ml⁻¹ monocitos con/sin la línea celular de neuroblastoma CHLA-255 (-70-80 % de confluencia) en presencia de aTNF α neutralizante o un control de isotipo adecuado durante puntos de tiempo especificados. Después de la incubación, las células se fijaron inmediatamente mediante la adición de un volumen igual de tampón de fijación BD PhosFlow Cytotfix precalentado a 37°C; las placas se incubaron durante 10 min adicionales a 37°C y después las células se recogieron. Para la permeabilización, el Tampón BD Phosflow Perm IV, preenfriado a -20°C se añadió gota a gota al sedimento celular y se incubó durante 15-20 min adicionales a RT. Los tubos se almacenaron a -20°C hasta que se tiñeron con mAb específico anti-fosfo p65 de NF κ B marcado con Alexa Fluor 488 (o I κ B α premarcado) y anticuerpo monoclonal anti-CD56 marcado con PE o APC (mAb) para identificar NB y monocitos en cocultivo.

El análisis se realizó en un citómetro de flujo de cuatro láser LSR-II (BD Biosciences) usando software BD FACDiva v. 6.0 y FlowJo 7.2.5 (Tree Star, Inc).

Experimentos *in vivo*. Los ratones NOD/SCID/IL2rgamma(null) (NSG) se criaron en la instalación animal TCH. Se irradiaron ratones de cuatro semanas de edad con 225 cGy y se les inyectaron células madre CD34⁺ derivadas de sangre del cordón humano como se ha descrito previamente (Yahata *et al.*, 2002; Giassi *et al.*, 2008). La frecuencia de las células CD34⁺ fue >95 % y la contaminación por células CD3⁺ fue menor del 0.1 % en los trasplantes de células madre. Tres meses después de SCT, la reconstitución de la hematopoyesis humana se confirmó en sangre periférica por FACS y se inyectaron a los ratones i/v células CHLA255/luc humanas bajo la cápsula renal (experimentos de localización) como se ha descrito previamente (Kim *et al.*, 2002) o intravenosamente (experimentos terapéuticos). El crecimiento tumoral se evaluó indirectamente por imagenología bioluminiscente semanal (instalación Small Animal Imaging Core, TCH). Cuando se indica, se inyectaron intraperitonealmente a los ratones 100 μg /ratón de mAb neutralizante anti-CCL2 (24822), anti-CCL20 (67310), o de control de isotipo (11711) (R&D Systems). Algunos animales recibieron inyecciones intravenosas de NKT humanos expandidos *ex vivo* (1.5×10^7 células). Antes de la inyección en los animales, los NKT se habían cultivado con IL-2, 50 U/ml (Peprotech) durante 7-10 días sin estimulación de TCR para conseguir una fase sin estimulación cuando su patrón de movimiento se asemejaba más

de cerca al de los NKT primarios como determinamos previamente (Metelitsa *et al.*, 2008). Los ratones se sacrificaron después de 72 h, y las suspensiones celulares preparadas a partir de tumores se analizaron por citometría de flujo multicolor como se ha descrito en la sección "Citometría de flujo". Cuando se indica, la eficacia antitumoral de las células NKT se determinó por imaginología bioluminiscente. Los experimentos con animales se realizaron según los protocolos aprobados por IACUC.

Análisis estadísticos. En los experimentos *in vitro* e *in vivo*, las comparaciones entre los grupos se basaron en el ensayo de la *t* de Student no emparejado de dos colas o ANOVA de una vía con la comparación post-ensayo de Tukey-Kramer de las medias de los grupos. Las computaciones estadísticas se realizaron con software GraphPad Prism™ 5.0 (GraphPad Software).

Ejemplo 10

Neuroblastos y macrófagos que actúan como soporte de los neuroblastos como diana de células NKT con especificidad dual

Introducción. La infiltración de tumores primarios con células T Asesinas Naturales (NKT) con Vα24 invariable está asociada con un buen resultado en neuroblastoma y otros tipos de cáncer. Los estudios mecanísticos revelaron que, en lugar de atacar a las células tumorales directamente, las células NKT tienen como diana macrófagos asociados al tumor (TAM) positivos para CD1d. Sin embargo, el control inmune efectivo del tumor también puede requerir el ataque directo y específico frente a las células tumorales.

Métodos. Las células NKT humanas propagadas *ex vivo* se prepararon por ingeniería usando un vector retroviral que codificaba un receptor de antígeno quimérico (CAR) que tiene como diana el gangliósido GD2 que está altamente expresado por las células de neuroblastoma y representa una diana terapéutica clínicamente validada. La actividad funcional del TCR nativo y CAR.GD2 en las células NKT modificadas genéticamente se ensayó usando TAM CD1d+ y células de neuroblastoma GD2+, respectivamente. A continuación, codificamos endodominios coestimuladores *en cis* con CAR.GD2 (CD28, CD134, CD137 y sus combinaciones) para permitir la señalización mediada por CAR óptima para la citotoxicidad, producción de citoquinas, proliferación, y supervivencia de las células NKT.

Resultados. La expresión de las construcciones CAR.GD2 hizo que las células NKT fueran altamente citotóxicas frente a células de neuroblastoma positivas para GD2 mientras dejaba su citotoxicidad nativa restringida por CD1d inalterada. Solo las células NKT CAR.GD2 que expresaban los endodominios coestimuladores de CD28, CD134, y/o CD137 experimentaron una rápida proliferación después de la estimulación específica suficiente para permitir la expansión a escala clínica de las células NKT modificadas genéticamente. Aunque la transferencia adoptiva de las células NKT parentales solo suprimió transitoriamente el crecimiento de neuroblastoma metastásico en ratones humanizados NOD/SCID/IL-2γ(null), las células NKT que expresaban CAR.GD2 con los endodominios de CD28 o CD137 tuvieron una actividad antimetastásica potente y duradera. Además, hubo una polarización llamativa y previamente no anticipada semejante a Th2 (IL-4 e IL-10) y semejante a Th1 (IFNγ y GM-CSF) de las células NKT que expresaban CAR.GD2/CD28 y CAR.GD2/CD137, respectivamente.

Conclusión. Las células NKT preparadas por ingeniería para expresar CAR.GD2 con endodominios coestimuladores pueden expandirse a una escala clínica, teniendo como diana tanto los neuroblastos como TAM que soportan a los neuroblastos, y tienen una actividad antitumoral potente. Además de dirigir la citotoxicidad de las células NKT hacia las células tumorales, las construcciones CAR que contienen endodominio coestimulador de CD137 pueden programar a las células NKT para producir grandes cantidades de IFNγ y GM-CSF que, a su vez, activan múltiples tipos de células efectoras antitumorales. Estos resultados establecen que las células NKT pueden servir como una nueva plataforma para la terapia con CAR antitumoral en neuroblastoma y otros tipos de cáncer.

Ejemplo 11

Realizaciones particulares de la invención

La invención proporciona una inmunoterapia efectiva para el cáncer que usa propiedades naturales y consecuentes de la preparación por ingeniería de NKT para tomar como diana tanto las células estromales que soportan el tumor como las células tumorales en sí mismas.

La importancia de los NKT para la inmunidad antitumoral e inmunoterapia se ha demostrado en múltiples modelos de cáncer (Swann *et al.*, 2007; Dhodapkar, 2009; Song *et al.*, 2007). La infiltración de las células NKT en tumores primarios estaba asociada con un buen resultado en niños con NB (Metelitsa *et al.*, 2004), un descubrimiento que se ha extendido desde entonces por otros investigadores a las malignidades de adultos (Tachibana *et al.*, 2005; Moiling *et al.*, 2007). Los descubrimientos recientes indican que, en lugar de atacar a las células tumorales directamente, los NKT tienen como diana los TAM positivos para CD1d, que proporcionan un soporte estromal esencial para las células tumorales (Song *et al.*, 2009; De Santo *et al.*, 2008). Sin embargo, además de atacar al estroma tumoral, el control inmune efectivo del tumor también puede requerir el ataque directo y específico frente a las células tumorales. La infusión de EBV-CTL injertadas con un CAR que tiene como diana el antígeno GD2 expresado por los neuroblastos (CAR.GD2) proporciona respuestas tumorales objetivas en pacientes con NB refractario/recidivante (Pule *et al.*, 2008; Louis *et al.*, 2011). En realizaciones de la invención, los NKT modificados genéticamente con CAR.GD2 tienen una

eficacia antitumoral en NB al tomar como diana los TAM que soportan los neuroblastos y los neuroblastos en sí mismos.

El conocimiento acumulado de la biología de las células NKT humanas sugiere que, como con otras células T (Maher *et al.*, 2002; Porter *et al.*, 2011), el potencial terapéutico de los NKT que expresan CAR podría incrementarse proporcionando señales coestimuladoras óptimas. Para caracterizar esto adicionalmente, los inventores generaron construcciones de CAR.GD2 con endodominios coestimuladores ejemplares: CD28, OX40, y/o CD137. Además, IL-15 protege a los NKT frente a la hipoxia inducida por el tumor y se demostró que la expresión transgénica de IL-15 en NKT aumenta dramáticamente su actividad antimetastásica (Liu *et al.*, 2012). Con este conocimiento, los inventores generaron nuevas construcciones CAR.GD2 que codifican tanto endodominios coestimuladores como IL-15 (vectores bicistrónicos). Para asegurar la seguridad y aplicabilidad clínica de la modificación genética, también generamos previamente vectores tricistrónicos en los que CAR y IL-15 se acoplaron con la expresión de la caspasa-9 inducible (iCasp-9), que se activa por un fármaco no tóxico, CID AP1903 (Quintarelli *et al.*, 2007; Hoyos *et al.*, 2010), formando un interruptor suicida que se ha encontrado que se seguro y altamente efectivo en un ensayo clínico de fase I reciente (Di *et al.*, 2011).

Lo siguiente muestra determinadas realizaciones de la invención.

Se produce la expresión de CAR.GD2 en NKT y su citotoxicidad *in vitro* se ensaya frente a células de NB y la actividad antitumoral *in vivo* frente a xenoinjertos de NB en ratones hu-NSG. Las células NKT aisladas de pacientes con NB se expanden *ex vivo* y se transducen con la construcción retroviral CAR.GD2. Los NKT CAR.GD2+ se ensayan para determinar su citotoxicidad *in vitro* frente a líneas celulares de NB GD2+ y para determinar su citotoxicidad nativa frente a células CD1d+. Los estudios *in vivo* de NKT CAR.GD2+ trasferidas de forma adoptiva evalúan su persistencia, localización tumoral, y eficacia antitumoral usando modelos establecidos de NB en ratones hu-NSG.

Hay expresión de CAR.GD2 con endodominios coestimuladores en NKT y se caracterizan su persistencia y actividad antitumoral *in vivo*. Los NKT se transducen con construcciones CAR.GD2 diseñadas con restos coestimuladores que se sabe que proporcionan señales coestimuladores importantes para NKT: CD28, 4-1BB, CD28/CD137, o CD28/OX40. Los experimentos *in vitro* seleccionan aquellas construcciones que, en respuesta a la estimulación con GD2, soportan una proliferación superior de las células NKT y respuesta de citoquinas sesgada hacia Th1, mientras mantiene intacta la especificidad nativa del TCR de NKT y la capacidad de matar TAM. Los NKT modificados con estas construcciones seleccionadas se evalúan entonces para determinar la expansión, persistencia, y eficacia antitumoral incrementada *in vivo* en los modelos de NB en hu-NSG.

Hay expresión de CAR.GD2/IL-15 en NKT y se caracterizan su persistencia y actividad antitumoral *in vivo*. CAR.GD2/IL-15 se expresa en los NKT usando un vector tricistrónico que codifica CAR.GD2 con un endodominio coestimulador, IL-15, e iCasp9. Los NKT CAR.GD2/IL-15 se evaluarán para determinar su capacidad de soportar la expansión, persistencia a largo plazo, y eficacia antitumoral incrementada de las células NKT *in vivo* en los modelos de NB en hu-NSG. El tratamiento con AP1903 se usará para ensayar la eficacia del interruptor suicida iCasp-9 para la eliminación de los NKT modificados genéticamente.

Hay producción de un vector retroviral de grado GMP y la validación de su actividad usando NKT de pacientes con NB. Una vez se selecciona la construcción, se puede generar una línea celular productora retroviral estable y hay producción de una preparación madre del vector de grado clínico que se usa para transducir NKT derivados de pacientes, cuyas propiedades funcionales y actividad antitumoral se validan en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Las realizaciones específicas son como sigue: 1) evaluación del papel del eje CCL20/CCR6 en el mecanismo de la localización de las células NKT en los tejidos tumorales hipóxicos; 2) expresión de mbIL-7-ODDD en NKT humanos para una supervivencia mejorada en hipoxia y para ensayar el potencial antitumoral de NKT mbIL-7 frente a xenoinjertos de neuroblastoma humano en ratones NOD/SCID; evaluación del potencial terapéutico antitumoral de la inmunoterapia combinada con NKT o NKT mbIL-7 y células T anti-GD2 CAR.

Como se demuestra al menos en las Fig. 10-13, un subconjunto de células previamente desconocido en las líneas celulares de NB y tumores primarios expresa TNF α unido a membrana (mb). Estas células tumorales proinflamatorias indujeron la producción de la quimioquina CCL20 de los TAM mediante la activación de la ruta de señalización de NF- κ B, un efecto que se amplificó en hipoxia. Los análisis por citometría de flujo de los tumores de NB humanos primarios revelaron la acumulación selectiva de CCL20 en los TAM. La neutralización de la quimioquina inhibió la migración *in vitro* de los NKT hacia monocitos hipóxicos condicionados por el tumor y la localización de los NKT en los injertos de NB en ratones. La hipoxia afecta la viabilidad y la función de las células NKT. Así, el movimiento de las células NKT hacia TAM productores de CCL20 sirvió como una trampa hipóxica para los NKT infiltrantes de tumor.

Como la expresión de mbIL-7-ODDD en NKT no fue capaz de rescatarlos del efecto inhibitorio de la hipoxia, como una estrategia alternativa, los inventores ensayaron otras citoquinas que comparten una cadena gamma común. IL-2 e IL-15 protegieron a los NKT activados por antígeno frente a la hipoxia. Además, la expresión transgénica de IL-15 en NKT transferidos de forma adoptiva aumentó dramáticamente su actividad antimetastásica en ratones. Así, la producción de quimioquinas inducida por el tumor en TAM hipóxicos y la quimioatracción e inhibición consecuentes de los NKT representa un mecanismo de escape inmune que puede revertirse por la inmunoterapia adoptiva con NKT

transducidos con IL-15.

Nuevos modelos. Para estudiar el potencial terapéutico de los NKT, los inventores han desarrollado nuevos modelos de NB ortotópico y metastásico en ratones hu-NSG que están reconstituidos con células madre hematopoyéticas humanas CD34+. Estos modelos únicos tienen una alta relevancia clínica porque permiten, por primera vez, estudiar la localización tumoral de los NKT humanos u otras células efectoras inmunes y su interacción no solo con las células de NB humano, sino también con células estromales humanas (p. ej., TAM) de origen hematopoyético en los tejidos tumorales.

La presente invención proporciona un nuevo concepto de inmunoterapia en la que las células tumorales y las células estromales que soportan el tumor se toman como diana simultáneamente para conseguir la máxima eficacia terapéutica. En este estadio, los inventores usan NKT o NKT IL-15 y células T CAR.GD2 para tomar como diana los TAM y neuroblastos, respectivamente. Las células T CAR.GD2 ya se han ensayado clínicamente en pacientes con NB, pero la presente invención proporciona inmunoterapia combinada de células T CAR.GD2 con NKT o NKT IL-15. En determinados aspectos de la invención, los NKT están provistos de reactividad dual para tomar como diana tanto neuroblastos como TAM.

Ejemplo 12

Estudios ejemplares

En realizaciones de la invención, se presenta la localización de células NKT humanas en el sitio tumoral en el modelo de NB en hu-NSG. (véase Liu et al, J. Clin. Invest (2012)).

En realizaciones de la invención, IL-15 protege a los NKT de la inhibición por los TAM y aumenta la actividad antimetastásica.

IL-15 protegió a los NKT humanos activados con antígeno frente a la hipoxia, y la expresión transgénica de IL-15 en NKT transferidas de forma adoptiva aumentó dramáticamente su actividad antimetastásica en el modelo en hu-NSG de NB, Figs. 6 y 7 (Liu et al., 2012).

En realizaciones de la invención, los NKT se modifican para coexpresar CAR-GD2 funcional. Los restos coestimuladores derivados de CD28, 4-1BB, y OX40, por ejemplo, pueden incorporarse *en cis* en moléculas de CAR y proporcionan coestimulación a las células T modificadas con CAR (Pule et al., 2008; Maher et al., 2002; Vera et al., 2009). Los inventores construyeron una serie de CAR que incorporan CD28, OX40 o tanto CD28/OX40 como CD28/4-1BB (Fig. 11A), y encontraron que estas moléculas pueden ser expresadas de manera eficiente en los NKT (Fig. 11B). Además, la expresión de CAR permanece estable durante al menos 3 semanas de expansión de células NKT *ex vivo* (Fig. 11B). La comparación paralela de NKT CAR.GD2 y células T de los mismos individuos demostró una citotoxicidad igualmente potente *in vitro* frente a células de NB positivas para GD2 (Fig. 11C). No se observó ninguna diferencia en la citotoxicidad específica de GD2 entre NKT transducidos con cualquiera de las 5 construcciones. De forma importante, los NKT CAR.GD2 retuvieron su especificidad de TCR nativa y mataron a las dianas CD1d+ tan eficientemente como los NKT parentales (Fig. 11D).

En realizaciones de la invención, la activación farmacológica del gen suicida iCasp-9 elimina eficientemente los linfocitos T modificados genéticamente en pacientes con leucemia. (véase, Di Stasi et. al., N. Engl. J. Med (2011)).

Estrategias ejemplares

Expresar CAR.GD2 en NKT y ensayar su citotoxicidad *in vitro* frente a células de NB y actividad antitumoral *in vivo* frente a xenoinjertos de NB en ratones hu-NSG.

Aunque los CTL específicos de EBV modificados con CAR tienen eficacia clínica en pacientes con varios tipos de cáncer, la dependencia de la infección con EBV limita esta estrategia, especialmente para pacientes jóvenes negativos para EBV. Como los NKT no dependen de infección y tienen un perfil funcional similar con células T efectoras-de memoria, se puede ensayar si los NKT podrían servir como una plataforma alternativa para la inmunoterapia redirigida por CAR para el cáncer. Un ensayo clínico reciente demostró que el tomar como diana GD2 con EBV-CTL modificados con CAR puede ser efectivo en niños con NB (Pule et al., 2008; Louis et al., 2011); se puede usar la misma construcción CAR.GD2 para transducir NKT. Estos NKT CAR.GD2+ se expanden y su potencial antitumoral frente a NB se ensaya usando nuestros sistemas experimentales establecidos *in vitro* e *in vivo*.

(a) Expresión de CAR.GD2 en NKT. Se aíslan NKT primarios a partir de PBMC de 5 individuos sanos y 5 pacientes con NB de estadio 4 en el diagnóstico usando mA b de biotina-6B11 y lechos magnéticos anti-biotina (Miltenyi) seguido de expansión *in vitro* con OKT3 e IL-2 como se ha descrito previamente (Metelitsa et al., 2004; Exley et al., 2008). Para expresar CAR.GD2 en NKT, las células estimuladas con OKT3 se transducen con el vector retroviral como se ha descrito en la Fig. 11B. También se puede expresar CAR.GD2 en células T de las mismas PBMC como se ha descrito previamente (de Santo et al., 2008). La expresión de CAR.GD2 se detecta por análisis de FACS, y las células CAR.GD2+ se enriquecen usando anticuerpo anti-idiotipo biotinilado, 1A7 (Pule et al., 2008) y lechos magnéticos anti-biotina (Miltenyi) seguido de expansión adicional con OKT3 e IL-2.

(b) Actividad funcional *in vitro* de NKT CAR.GD2. Para ensayar el potencial citotóxico de los NKT CAR.GD2, se pueden crecer líneas celulares de NB positivas para GD2 (CHLA-255, LA-N1), células de NB negativas para GD2 (LA-N-6) como un control negativo, y células Jurkat J32 GD2^{neg}CD1d⁺ como un control para citotoxicidad de células NKT restringida a CD1d. La citotoxicidad se realiza usando el ensayo de 4-hr de Calceína-AM con un rango de relaciones efector a diana. Las células T CAR.GD2 del mismo individuo pueden servir como un control positivo. También se puede medir la respuesta de citoquinas de las células NKT (IFN γ e IL-4, ELISA) y proliferación (ensayo de dilución de CFSE) después de estimulación de CAR y TCR V α 24i nativo por células NB GD2+ y J32 CD1d+, respectivamente. Sobre la base de los resultados obtenidos con NKT CAR.GD2 de 2 individuos sanos (Fig. 2B-D), se puede esperar que las células NKT CAR.GD2 de donantes sanos y pacientes con NB adquirirán citotoxicidad frente a células de NB GD2+ mientras retienen su especificidad de TCR y actividad funcional nativas.

(c) Persistencia *in vivo* y migración dirigida al tumor de los NKT CAR.GD2. Para examinar el efecto de la expresión de CAR.GD2 en la persistencia y localización tumoral de las células NKT, se pueden transducir NKT con eGFP-ffLuc seguido de transducción con CAR.GD2 o control de vector. Los ratones hu-NSG se injertan con xenoinjertos de NB humano bajo la cápsula renal y (en 2 semanas) se les inyectó i/v 10⁷ NKT control o NKT CAR.GD2. La distribución y la localización tumoral de las células NKT se monitorizan a las 24, 48, y 72 h usando imagenología BL. Después del sacrificio de los animales, se puede cuantificar la frecuencia de los NKT humanos transferidos en sangre, bazo, hígado, médula ósea, y tejidos tumorales. Los NKT parentales y modificados genéticamente pueden cuantificarse tanto por qPCR como por FACS, por ejemplo. La q-PCR puede realizarse en muestras de ADN de los tejidos indicados usando dos conjuntos de sonda/cebadores: gen TCR α con V α 24-J α 18 invariable y transgén CAR para todos los NKT humanos y NKT modificados genéticamente, respectivamente. La frecuencia y número absoluto de NKT y NKT CAR.GD2 también puede cuantificarse por FACS usando inmunofluorescencia de cuatro colores con anticuerpos frente a CD3 humano, V β 11, V α 24-J α 18, y CAR. Los NKT y NKT CAR.GD2 también pueden compararse respecto a la expresión de anexina-V y Ki-67+ para determinar la tasa de apoptosis y proliferación, respectivamente. En los tejidos tumorales, se puede examinar si la expresión de CAR afecta la distribución de las células NKT entre las áreas normóxicas e hipóxicas, así como su colocalización con TAM y células de NB, usando métodos de microscopía confocal conocidos (Liu et al., 2012). Los resultados de estos experimentos demuestran cómo la expresión de CAR.GD2 afecta la persistencia de las células NKT *in vivo*, la localización en el sitio tumoral y revelan el mecanismo de la función efectora de las células NKT CAR.GD2 en los tejidos tumorales, en determinados aspectos de la invención.

(d) Actividad antitumoral de los NKT CAR.GD2 en el modelo de NB ortotópico en hu-NSG. Los ratones hu-NSG se injertan bajo la cápsula renal con células de NB humano CHLA-255 ffLuc+ y se dividen en tres grupos para el tratamiento con 10⁷ NKT, NKT CAR.GD2, o PBS como un control. La eficacia antitumoral se evalúa por imagenología BL semanal (durante 4 semanas) y tiempo hasta el sacrificio. Los NKT CAR.GD2 consiguen una mayor actividad antitumoral, en realizaciones específicas de la invención, sostenida durante más tiempo comparado con NKT no modificados. Aunque los NKT CAR.GD2 y las células T CAR.GD2 son igualmente citotóxicos *in vitro* (Fig. 11C), los primeros se espera que tengan una actividad terapéutica más fuerte en ratones debido a la muerte o polarización M1 (mediante la secreción de IFN γ y GM-CSF) de los TAM. Los NKT se analizan en xenoinjertos de tumor y en tejidos normales como se ha descrito anteriormente. También se puede examinar si la eficacia terapéutica está asociada con la toma como diana directa por las células NKT de las células tumorales, la reducción de la frecuencia de TAM en los tejidos tumorales, polarización M1 incrementada de los TAM remanentes, y/o niveles disminuidos de IL-6 humano promotor de neuroblastos (Song et al., 2009) en el interior de los tumores y sistémicamente. El examen patológico de los tejidos normales también puede evaluar la toxicidad de la inmunoterapia con células NKT. Los resultados de estos experimentos muestran el uso terapéutico *in vivo* de NKT CAR.GD2 para la aplicabilidad clínica.

(e) Actividad antitumoral de los NKT CAR.GD2 en el modelo de NB metastásico en ratones hu-NSG. Cuando se inyectan intravenosamente en ratones hu-NSG, las células CHLA-255/luc proporcionan un modelo metastásico excelente de NB que reproduce de cerca el patrón de metástasis en pacientes con NB (Fig. 10B). La transferencia adoptiva de NKT humanos tiene solo un efecto transitorio en este modelo de NB metastásico (Liu et al., 2012). Para ensayar si la expresión de CAR.GD2 hace que los NKT sean protectores frente a las metástasis de NB, se pueden inyectar células CHLA-255/luc i.v. a ratones y dividirlos en los siguientes grupos para recibir: 1) PBS (control); 2) NKT parentales; 3) NKT CAR.GD2; 4) células T CAR.GD2. Los experimentos iniciales se realizan en el día 7, que es al menos una semana antes de que las metástasis de NB se vuelvan detectables por imagenología BL. Si los NKT CAR.GD2+ son efectivos en este entorno, se puede repetir el mismo tratamiento después de que las metástasis de NB se hayan vuelto detectables por imagenología BL. *Post mortem*, se analizan los NKT y las células T en metástasis tumorales en diferentes órganos y en tejidos normales como se ha descrito anteriormente. Se puede observar si hay acumulación de NKT CAR.GD2 comparado con los NKT control en la médula ósea porque es el sitio más frecuente de metástasis de NB y recidiva. Los resultados de estos experimentos muestran el potencial terapéutico de los NKT CAR.GD2 frente a NB metastásico, en aspectos particulares de la invención.

Expresar CAR.GD2 con endodominios coestimuladores en NKT y ensayar su persistencia y actividad antitumoral *in vivo*.

La coestimulación juega un papel crítico en la activación, expansión, y supervivencia de los NKT. Sobre la base del conocimiento actual de las principales rutas coestimuladores en NKT, se generaron cuatro construcciones que contenían endodominios coestimuladores y sus combinaciones: CD28, 4-1BB, CD28/4-1BB y CD28/OX40, y la construcción control que carece de endodominios coestimuladores. Se puede determinar cuál de estas construcciones

proporciona la coestimulación más efectiva para NKT CAR.GD2.

- (a) Actividad *in vitro* de NKT CAR.GD2 con diferentes restos coestimuladores. En primer lugar, se puede ensayar cómo la expresión de restos coestimuladores afecta la citotoxicidad, producción de citoquinas, y proliferación *in vitro* de NKT CAR-GD2 en respuesta a células de NB GD2+, así como células J32 CD1d+ como se describe en la presente memoria. Sobre la base de la experiencia acumulada con células T (Hoyos *et al.*, 2010) y los datos con NKT, se puede esperar que la actividad citotóxica de los NKT CAR.GD2 no se verá influida por restos coestimuladores. Por el contrario, la producción de citoquinas Th1/Th2 y la proliferación se verán probablemente influidas por diferentes señales coestimuladoras. El cribado *in vitro* puede seleccionar aquellas construcciones CAR coestimuladoras que aumentan la expansión de las células NKT y polarizan su perfil de citoquinas hacia Th1.
- (b) Migración dirigida y persistencia *in vivo* de los NKT CAR.GD2 coestimuladores. Aquellos restos coestimuladores ejemplares que se seleccionan se evalúan para determinar la capacidad de soportar la persistencia y localización tumoral *in vivo* de NKT modificados con CAR.GD2. Por ejemplo, para determinar el efecto de la expresión de CD28 en CAR.GD2, se pueden transducir NKT con eGFP-ffLuc seguido de transducción con CAR.GD2 o CAR.GD2/CD28. Los ratones hu-NSG se injertan con xenoinjertos de NB humano y se les inyecta i/v NKT CAR.GD2 o CAR.GD2/CD28. La localización tumoral y la persistencia de las células NKT se analizan usando imaginería BL, FACS, y microscopía confocal como se describe en la presente memoria. Se puede esperar que los NKT que expresan CAR.GD2/CD28 y/o otras construcciones coestimuladoras seleccionadas + tendrán una expansión, persistencia, y acumulación en el sitio tumoral superior *in vivo*, en realizaciones específicas de la invención.
- (c) Actividad antitumoral de NKT CAR.GD2 coestimuladores en el modelo de NB ortotópico en ratones hu-NSG. Como se describe aquí, se pueden usar ratones hu-NSG con xenoinjertos de NB establecidos (con células de NB luminiscentes) y tratarlos con CAR.GD2, CAR.GD2/CD28, y/o otras construcciones coestimuladoras no luminiscentes. La eficacia antitumoral se evalúa por imaginería BL una vez a la semana durante 4 semanas. Los NKT modificados para expresar CAR.GD2 con restos coestimuladores tendrán una actividad antitumoral superior que aquellos con CAR.GD2+ solo, en aspectos particulares de la invención.
- (d) Actividad antitumoral de NKT CAR.GD2 coestimuladores en el modelo de NB metastásico en ratones hu-NSG. Los mismos grupos experimentales que los descritos anteriormente se ensayan en el modelo de NB metastásico como se ha descrito anteriormente. Los NKT modificados para expresar CAR.GD2 con restos coestimuladores tienen una actividad antimetastásica superior que aquellos con CAR.GD2 solo, en realizaciones específicas de la invención.

Expresar CAR.GD2/IL-15 en NKT y ensayar su persistencia y actividad antitumoral *in vivo*.

- Para maximizar el potencial terapéutico de los NKT frente a NB, se puede combinar la expresión de IL-15 y CAR.GD2 que permitirá la persistencia a largo plazo de las células transferidas de forma adoptiva y proporciona la capacidad de matar tanto a los TAM que soportan el tumor como a los neuroblastos en sí mismos. La seguridad adicional de las células transducidas se proporciona desarrollando un vector, en el que se clona el gen suicida iCasp-9 conjuntamente con los genes de CAR e IL-15. Para conseguir la expresión efectiva de los tres genes (IL-15, iCasp-9, y CAR.GD2) en NKT, se puede generar una única construcción retroviral tricistrónica (Fig. 13), análoga a la que se ha mostrado que expresa con éxito iCasp9, CAR.CD19-CD28 e IL-15 en células T que permitió la expresión eficiente y funcional de los tres genes (Hoyos *et al.*, 2010).
- a) Expresión y actividad funcional *in vitro* de IL-15 y CAR.GD2 en NKT. Usando el mismo procedimiento que el descrito anteriormente, se pueden transducir NKT con una construcción retroviral tricistrónica, que contiene secuencias de ADNc para IL-15, CAR-GD2/CD28, e iCasp-9 (Fig. 13). Para controlar el efecto de IL-15 o CAR.GD2 solos, se pueden comparar los NKT transducidos con IL-15/CAR.GD2 con aquellos transducidos bien con IL-15 o CAR.GD2 solo. También se puede ensayar la funcionalidad del gen suicida iCasp-9 usando el tratamiento *in vitro* de las células transducidas con CID AP1903 como se ha descrito previamente (Quintarelli *et al.*, 2007; Tey *et al.*, 2007).
- (b) Migración dirigida y persistencia *in vivo* de NKT CAR.GD2/IL-15. Para examinar si la coexpresión de IL-15 y CAR.GD2 aumenta la migración tumoral dirigida y la persistencia de las células NKT, se pueden transducir NKT con eGFP-ffLuc seguido de transducción con CAR.GD2/IL-15. Los ratones hu-NSG se injertan con xenoinjertos de NB humano y se les inyectan i/v NKT CAR.GD2, IL-15+, CAR.GD2/IL-15+, o control (10^7 células/ratón). La localización tumoral de las células NKT se monitoriza a los 1, 2, 3, 5, y 7 días usando imaginería BL seguido del sacrificio y análisis por FACS en sangre, bazo, hígado, médula ósea, y tejidos tumorales. La distribución de los NKT infiltrantes en los tejidos tumorales se analiza por microscopía confocal, incluyendo análisis cuantitativo de su frecuencia en áreas hipóxicas usando tinción EF5 (Liu *et al.*, 2012). Los NKT que expresan IL-15 y CAR.GD2 tendrán una expansión y persistencia superior *in vivo*, así como una acumulación y supervivencia aumentadas en el sitio tumoral incluyendo áreas hipóxicas, en realizaciones específicas de la invención.
- (c) Control de NKT transducidos con CAR.GD2/IL-15 mediante la activación farmacológica de la caspasa-9. Como la construcción retroviral incorpora iCasp-9 (Fig. 12), se puede ensayar si los NKT modificados genéticamente pueden eliminarse eficientemente por la activación farmacológica del gen suicida después de la administración de la molécula pequeña CID AP1903 (Quintarelli *et al.*, 2007; Tey *et al.*, 2007). Después de conseguir la expansión/persistencia sostenida *in vivo* de los NKT CAR.GD2/L-15 en ratones hu-NSG, se inyecta a los ratones i/p CID AP1903. Los ratones

se someten a imaginología antes y 24 hr después de la inyección del fármaco. Si la señal de BL desaparece, se pueden sacrificar los ratones y realizar qPCR para el transgén CAR usando ADN de múltiples tejidos para confirmar la eliminación de los NKT transgénicos. Si la eliminación no es completa, se puede titular la dosis de CID AP1903 para conseguir el efecto completo como se ha descrito para las células T.

- 5 (d) Actividad antitumoral de NKT CAR.GD2/IL-15 en modelos de NB en hu-NSG. Como se ha descrito anteriormente, se pueden usar ratones hu-NSG con xenoinjertos de NB ortotópico o metastásico establecido y tratarlos con NKT CAR.GD2, IL-15, CAR.GD2/IL-15, o control. La eficacia antitumoral se evalúa por imaginología BL una vez a la semana durante 4 semanas. Los NKT CAR.GD2/IL-15 son más efectivos que los NKT CAR.GD2 o IL-15, en determinadas realizaciones.

10 **Producir un vector retroviral de grado GMP y validar su actividad usando NKT de pacientes con NB.**

Los resultados del ensayo preclínico de NKT transducidos con varias construcciones CAR.GD2 o GAR.GD2/IL-15 anteriores producen información respecto a qué construcción genera NKT terapéuticos que son seguros y tienen un alto potencial antitumoral para pacientes con NB. En realizaciones específicas, GAR.GD2/IL-15 tiene el mayor potencial terapéutico de las construcciones ensayadas. Pueden utilizarse las construcciones alternativas (p. ej., CAR.GD2/CD28, CAR.GD2/4-1.BB, o la CAR.GD2 de 1ª generación). Se genera una línea celular productora retroviral estable y se produce una preparación madre del vector de grado clínico que se usará para transducir NKT derivados de pacientes.

- 20 a) Generar una línea celular productora retroviral de grado clínico y sobrenadante retroviral. Se puede generar la línea celular productora retroviral estable, produciendo partículas virales que codifican CAR.GD2/IL-15 o una de las construcciones alternativas. Se generará la línea celular de empaquetamiento PG13 que produce partículas retrovirales de pseudotipo GaLV como se ha descrito previamente (Pule *et al.*, 2008; Savoldo *et al.*, 2011). Puede producirse una línea productora estable con una titulación viral $>10^6$ p.v. por mL (sobre la base de la infectividad de células HeLa). Aunque la titulación puede disminuir cuando se fabrica el producto a granel, debería superar aún así 5×10^5 p.v. por mL, lo que proporcionará una amplia cantidad de virus con actividad adecuada para transducir las células NKT, en determinadas realizaciones.

- 30 (b) Preparar NKT modificados genéticamente a partir de pacientes con NB. Los NKT pueden aislarse a partir de PBMC de pacientes con NB fallecidos usando mAb biotina-6B11 y lechos magnéticos anti-biotina (Miltenyi) seguido de la expansión *in vitro* en placas recubiertas con OKT3. Para validar la actividad de un vector de grado clínico, los NKT activados con OKT3 se transducen con sobrenadante retroviral usando placas de 24 pocillos recubiertas con fragmentos de retronectina recombinantes como se ha descrito previamente (Pule *et al.*, 2008). Después de la transducción, los NKT se expanden con IL-2 para alcanzar el número de células requerido para el protocolo clínico. La eficiencia de la transducción se mide cuantificando la expresión de epítipo de idiotipo CAR.

- 35 (c) Actividad funcional *in vitro*. Los NKT modificados con el vector de grado clínico se ensayan usando experimentos funcionales *in vitro* que son apropiados para la construcción seleccionada y se describen en otro lugar de la presente memoria.

(d) La migración dirigida y la persistencia *in vivo* se examinan como se describe en otro lugar de la presente memoria.

(e) El control de los NKT modificados genéticamente mediante la activación farmacológica de la caspasa-9 se examina como se describe en otro lugar de la presente memoria.

(f) La actividad antitumoral en los modelos de NB se examina como se describe en otro lugar de la presente memoria.

- 40 Puede demostrarse que los NKT modificados genéticamente de grado GMP pueden producirse a partir de PBMC específicos de pacientes en números clínicamente suficientes y tienen actividad antitumoral mientras retienen sus funciones fisiológicas.

Ejemplo 13

Realizaciones particulares de NKT con receptores de antígeno quiméricos

- 45 En realizaciones de la invención, se presenta una célula NKT con uno o más CAR, y la célula NKT también puede expresar IL-15, IL-2, IL-4, y/o IL-7. Véase la Figura 11A para construcciones CAR ejemplares.

- 50 La FIG. 14 muestra la generación y expansión efectivas de NKT CAR.GD2. La FIG. 15 muestra que los NKT CAR.GD2 están provistos de una especificidad dual frente a las dianas GD2+ y CD1d+. La FIG. 16 demuestra que los endodominios coestimuladores en las construcciones CAR.GD2 afectan el perfil de citoquinas de las células NKT. La FIG. 17 muestra que los endodominios coestimuladores en las construcciones CAR.GD2 afectan las rutas de señalización Th1 y Th2 en los NKT. La FIG. 18 muestra la eficacia terapéutica de NKT CAR.GD2 frente a metástasis de NB en ratones hu-NSG.

Así, las FIGS. 14-18 demuestran lo siguiente: 1) los GD2.CAR pueden expresarse de forma estable en NKT humanos y se mantiene un alto nivel de expresión del transgén durante el periodo suficiente para una expansión a escala clínica

ex vivo; 2) los NKT GD2-CAR presentan una especificidad dual con alto potencial citotóxico frente a células de NB GD2+ y macrófagos CD1d+(M2), pero no matan a las células negativas para GD2 y CD1d; 3) los endodominios CD28 y 4-1BB inclina la respuesta de citoquinas de NKT CAR.GD2 al patrón Th2 y Th1, respectivamente; 4) la polarización Th2 inducida por CD28 está asociada con la activación de AKT y STAT6. La polarización Th1 inducida por 4-1BB está asociada con la activación de las rutas p65 NPkB y p38 MAPK; y 5) los NKT que expresan GD2.CAR tienen una actividad terapéutica potente en un modelo metastásico de neuroblastoma en ratones hu-NSG, proporcionando una base racional para el ensayo clínico de NKT con especificidad dual en niños con neuroblastoma. En realizaciones de la invención, una construcción de expresión en el NKT comprende 4-1BB o una combinación de 4-1BB y CD28, de manera que se induce la polarización Th1, dando lugar de esta manera a rutas relevantes para el cáncer; en realizaciones específicas, CD28 permite una proliferación aumentada de las células NKT.

Referencias

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

Publicaciones

- 15 Affara,N.I., y Coussens,L.M. 2007. IKKalpha at the crossroads of inflammation and metastasis. Cell 129:25-26.
- Aliavena,P., Sica,A, Solinas,G., Porta,C., y Mantovani,A 2008. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. Grit Rev. Oncol. Hematol. 66:1-9.
- Baev,D.V., Peng,X.H., Song,L., Barnhart,J.R., Crooks,G.M., Weinberg,K.I., y Metelitsa,L.S. 2004. Distinct homeostatic requirements of CD4+ and CD4-subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans. Blood 104:4150-4156 (2004).
- 20 Battaglia,F., Delfino,S., Merello,E., Puppo,M., Piva,R., Varesio,L., y Bosco,M.C. 2008. Hypoxia transcriptionally induces macrophage-inflammatory protein-3alpha/CCL-20 in primary human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)-kappaB. J. Leukoc. Biol. 83:648-662.
- Bendelac,A. et al. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. Science 268, 863-865 (1995).
- 25 Bendelac,A., Savage,P.B., y Teyton,L. The biology of NKT cells. Annu. Rev. Immunol. 25, 297-336 (2007).
- Berzofsky,J.A., y Terabe,M. 2009. The contrasting roles of NKT cells in tumor immunity. Curro Mol. Med. 9:667-672.
- Brown,E.R., Charles,K.A., Hoare,S.A., Rye,R.L., Jodrell,D.I., Aird,R.E., Vora,R., Prabhakar,U., Nakada,M., Corringham,R.E. et al 2008. A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF-alpha inhibitor, in patients with advanced cancer. Ann. Oncol. 19:1340-1346.
- 30 Chang,D.H. et al. Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. J. Exp. Med. 201, 1503-1517 (2005).
- Crowe,N.Y., Coquet,J.M., Berzins,S.P., Kyparissoudis,K., Keating,R., Pellicci,D.G., Hayakawa,Y., Godfrey,D.I., y Smyth,M.J. 2005. Differential anti-tumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. J. Exp. Med. 202:1279-1288 (2005).
- 35 De Santo,C. et al. Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. J. Clin. Invest 118, 4036-4048 (2008).
- De,S.C., Arscott,R., Booth,S., Karydis,1., Jones,M., Asher,R., Salio,M., Middleton,M., y Cerundolo,V. 2010. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-1 O-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A Nat. Immunol. 11:1039-1046.
- 40 Dhodapkar,M.V. Harnessing human CD1d restricted T cells for tumor immunity: progress and challenges. Front Biosci. 14, 796-807 (2009).
- Dhodapkar,M.V., Geller,M.D., Chang,D.H., Shimizu,K., Fujii,S.I., Dhodapkar,K.M., y Krasovsky, J. 2003. A Reversible Defect in Natural Killer T Cell Function Characterizes the Progression of Premalignant to Malignant Multiple Myeloma. J. Exp. Med.
- 45 Di,S.A. et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. N. Engl. J. Med. 365, 1673-1683 (2011).
- Dotti,G., Savoldo,B., y Brenner,M. Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors: "are we nearly there yet?". Hum. Gene Ther. 20, 1229-1239 (2009).
- Exley,M.A. et al. Selective activation, expansion, and monitoring of human iNKT cells with a monoclonal antibody specific for the TCR alpha-chain CDR3 loop. Eur. J. Immunol. 38, 1756-1766 (2008).

- Fehniger,T.A. et al. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 193, 219-231 (2001).
- 5 Friedberg,J., Jacobsen,E., Neuberger,D., Kutok,J., Munoz,O., Boussiotis,V., Reynolds,H., Fisher,D., Szot,A., Van Den,A.A. et al 2008. Targeting the follicular lymphoma microenvironment through blockade of TNFalpha with etanercept. *Leuk. Lymphoma* 49:902-909.
- Giassi,L.J., Pearson,T., Shultz,L.D., Laning,J., Biber,K., Kraus,M., Woda,B.A, Schmidt,M.R., Woodland,R.T., Rossini,AA et al 2008. Expanded CD34+ human umbilical cord blood cells generate multiple lymphohematopoietic lineages in NOD-scid IL2rgamma(null) mice. *Exp. Biol. Med.* (Maywood.) 233:997-1012.
- Godfrey,D.I., Stankovic,S., y Baxter,A.G. Raising the NKT cell family. *Nat. Immunol.* 11, 197-206 (2010).
- 10 Goillot,E., Combaret,V., Ladenstein,R., Baubet,D., Blay,J.Y., Philip,T., y Favrot,M.C. 1992. Tumor necrosis factor as an autocrine growth factor for neuroblastoma. *Cancer Res.* 52:3194-3200.
- Greten,F.R., Eckmann,L., Greten,T.F., Park,J.M., Li,Z.W., Egan,L.J., Kagnoff,M.F., y Karin,M. 2004. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118:285296.
- Grivennikov,S.I., Greten,F.R., y Karin,M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Gel*140:883-899.
- 15 Hoyos,V. et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia* 24, 1160-1170 (2010).
- Hsu,C. et al. Cytokine-independent growth and clonal expansion of a primary human CD8+ T-cell clone following retroviral transduction with the IL-15 gene. *Blood* 109, 5168-5177 (2007).
- 20 Ishikawa,A. et al. A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 1910-1917 (2005).
- Kershaw,M.H. et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 6106-6115 (2006).
- Kim,C.H., Butcher,E.C., y Johnston,B. 2002. Distinct subsets of human Valpha24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends Immunol.* 23:516-519.
- 25 Kim,C.H., Johnston,B., y Butcher,E.C. 2002. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among Valpha24(+)Vbeta11 (+) NKT cell subsets with distinct cytokine producing capacity. *Blood* 100: 11-16.
- Kim,D.H. et al. 4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* 180, 2062-2068 (2008).
- 30 Kim,E.S., Serur,A., Huang,J., Manley,C.A., McCrudden,K.W., Frischer,J.S., Soffer,S.Z., Ring,L., New,T., Zabski,S. et al 2002. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:11399-11404.
- Kronenberg,M. y Gapin,L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 557-568 (2002).
- 35 Kunii,N. et al. Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci.* (2009).
- Lantz,O. y Bendelac,A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* 180, 1097-1106 (1994).
- Liu,D. et al. IL-15 protects NKT cells from inhibition by tumor-associated macrophages and enhances antitumorigenic activity. *J. Clin. Invest* 2012).
- 40 Louis,C.U. et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 118, 6050-6056 (2011).
- Maher,J., Brentjens,R.J., Gunset,G., Riviere,I., y Sadelain,M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.* 20, 70-75 (2002).
- Mantovani,A, Aliavena,P., Sica,A, y Balkwill,F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444.
- 45 Mantovani,A, Schioppa,T., Porta,C., Aliavena,P., y Sica,A 2006. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 25:315-322.
- Maris,J.M., Hogarty,M.D., Bagatell,R., y Cohn,S.L. 2007. Neuroblastoma. *Lancet* 369:21 06-2120.

- Matsuda,J.L., Gapin,L., Sidobre,S., Kieper,W.C., Tan,J.T., Ceredig,R., Surh,C.D., y Kronenberg,M. 2002. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat. Immunol.* 3:966-974.
- Metelitsa,L.S. et al. Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. *J. Exp. Med.* 199, 1213-1221 (2004).
- 5 Metelitsa,L.S., Naidenko,O.V., Kant,A, Wu,H.W., Loza,M.J., Perussia,B., Kronenberg,M., y Seeger,R.C. 2001. Human NKT cells mediate anti-tumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1 d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J. Immunol.* 167:3114-3122.
- Molling, J.W. et al. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 25, 862-868 (2007).
- 10 Motohashi,S. et al. A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J. Immunol.* 182, 2492-2501 (2009).
- Nieda,M. et al. Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 103, 383-389 (2004).
- 15 O'Konek,J.J., Iliarionov,P., Khursigara,D.S., Ambrosino,E., Izhak,L., Castillo,B.F., Raju,R., Khalili,M., Kim,H.Y., Howell,AR. et al 2011. Mouse and human iNKT cell agonist beta-mannosylceramide reveals a distinct mechanism of tumor immunity. *J. Clin. Invest* 121 :683-694.
- Pietras,A., Hansford,L.M., Johnsson,A.S., Bridges,E., Sjolund,J., Gisselsson,D., Rehn,M., Beckman,S., Noguera,R., Navarro,S. et al 2009. HIF-2alpha maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106:16805-16810.
- 20 Pikarsky,E., Porat,R.M., Stein,I., Abramovitch,R., Amit,S., Kasem,S., Gutkovich-Pyest,E., Urieli-Shoval,S., Galun,E., y Ben-Neriah,Y. 2004. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431 :461-466.
- 25 Porcelli,S., Yockey,C.E., Brenner,M.B., y Balk,S.P. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J. Exp. Med.* 178, 1-16 (1993).
- Porter,D.L., Levine,B.L., Kalos,M., Bagg,A., y June,C.H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 365, 725-733 (2011).
- 30 Pule,M.A. et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat. Med.* 14, 1264-1270 (2008).
- Quintarelli,C. et al. Co-expression of cytokine and suicide genes to enhance the activity and safety of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 110, 2793-2802 (2007).
- Reynolds,C.P., Tomayko,M.M., Donner,L., Helson,L., Seeger,R.C., Triche,T.J., y Brodeur,G.M. 1988. Biological classification of cell lines derived from human extra-cranial neural tumors. *Prog. Clin. Biol. Res.* 271 :291-306.
- 35 Riedl,S.J. y Salvesen,G.S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 405-413 (2007).
- Sato,N. et al. Development of an IL-15-autocrine CD8 T-cell leukemia in IL-15-transgenic mice requires the cis expression of IL-15Ralpha. *Blood* 117, 4032-4040 (2011).
- 40 Savoldo,B. et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J. Clin. Invest* 121, 1822-1826 (2011).
- Sica,A, y Bronte,V. 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest* 117:1155-1166.
- Sica,A, Larghi,P., Mancino,A, Rubino,L., Porta,C., Totaro,M.G., Rimoldi,M., Biswas,S.K., Aliavena,P., y Mantovani,A 2008. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin. Cancer Biol.* 18:349-355.
- 45 Song,L. et al. Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma. *J. Clin. Invest* 117, 2702-2712 (2007).
- Song,L. et al. Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J. Clin. Invest* 119, 1524-1536 (2009).
- Straathof,K.C. et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 105, 4247-4254 (2005).

- Swann,J., Crowe,N.Y., Hayakawa,Y., Godfrey,D.I., y Smyth,M.J. 2004. Regulation of antitumour immunity by CD1 d-restricted NKT cells. *Immunol. Cell Biol.* 82:323-331.
- Swann, J.B., Coquet,J.M., Smyth,M.J., y Godfrey,D.I. CD1-restricted T cells and tumor immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 314, 293-323 (2007).
- 5 Szlosarek,P., Charles,K.A., y Balkwill,F.R. 2006. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur. J. Cancer* 42:745-750.
- Szlosarek,P.W., y Balkwill,F.R. 2003. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol.* 4:565-573.
- 10 Tachibana,T. et al. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 11, 7322-7327 (2005).
- Tahir,S.M. et al. Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J. Immunol.* 167, 4046-4050 (2001).
- Tey,S.K., Dotti,G., Rooney,C.M., Heslop,H.E., y Brenner,M.K. Inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of allogeneic T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 913-924 (2007).
- 15 Thomas,S.Y., Hou,R., Boyson,J.E., Means,T.K., Hess,C., Olson,D.P., Strominger,J.L., Brenner,M.B., Gumperz,J.E., Wilson,S.B. et al 2003. CD1 d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th 1-type inflammatory homing cells. *J. Immunol.* 171 :2571-2580.
- Till,B.G. et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 112, 2261-2271 (2008).
- 20 Uldrich,A.P. et al. NKT cell stimulation with glycolipid antigen in vivo: costimulation-dependent expansion, Bim-dependent contraction, and hyporesponsiveness to further antigenic challenge. *J. Immunol.* 175, 3092-3101 (2005).
- van der Vliet,H.J. et al. Circulating myeloid dendritic cells of advanced cancer patients result in reduced activation and a biased cytokine profile in invariant NKT cells. *J. Immunol.* 180, 7287-7293 (2008).
- 25 Vera,J.F. et al. Accelerated production of antigen-specific T cells for preclinical and clinical applications using gas-permeable rapid expansion cultureware (G-Rex). *J. Immunother.* 33, 305-315 (2010)
- Vera,J.F., Brenner,M.K., y Dotti,G. Immunotherapy of human cancers using gene modified T lymphocytes. *Curr. Gene Ther.* 9, 396-408 (2009).
- Vinay,D.S. et al. CD137-deficient mice have reduced NK/NKT cell numbers and function, are resistant to lipopolysaccharide-induced shock syndromes, and have lower IL-4 responses. *J. Immunol.* 173, 4218-4229 (2004).
- 30 Waldmann,T.A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 6:595-601.
- Yahata,T., Ando,K., Nakamura,Y., Ueyama,Y., Shimamura,K., Tamaoki,N., Kato,S., y Hotta,T. 2002. Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. *J. Immunol.* 169:204-209.
- 35 Yanagisawa,K. et al. Hyporesponsiveness to natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide in cancer-bearing state mediated by CD11b+ Gr-1+ cells producing nitric oxide. *Cancer Res.* 66, 11441-11446 (2006).
- Yanagisawa,K., Seino,K., Ishikawa,Y., Nozue,M., Todoroki,T., y Fukao,K. 2002. Impaired proliferative response of V alpha 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide. *J. Immunol.* 168:6494-6499.
- Zaini,J. et al. OX40 ligand expressed by DCs costimulates NKT and CD4+ Th cell antitumor immunity in mice. *J. Clin. Invest* 117, 3330-3338 (2007).
- 40 Zou,W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* 5, 263-274 (2005).

REIVINDICACIONES

1. Una célula T asesina natural preparada por ingeniería que comprende una construcción de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que tiene como diana GD2.
- 5 2. La célula de la reivindicación 1, en donde el CAR comprende endodominios coestimuladores seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137, OX40, CD40, o una combinación de los mismos.
3. La célula de la reivindicación 1 o 2, que comprende una construcción de expresión que codifica IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 o una combinación de los mismos.
4. La célula de la reivindicación 3, en donde la construcción codifica IL-2 o IL-15, opcionalmente en donde la construcción codifica IL-15 o IL-15 humano.
- 10 5. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la construcción de expresión comprende un vector, opcionalmente
 - (i) en donde el vector es un vector retroviral, vector lentiviral, vector adenoviral, vector viral adeno-asociado, o plásmido; o
 - 15 (ii) en donde la construcción de expresión que codifica IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, o una combinación de los mismos y la construcción de expresión que codifica un CAR que tiene como diana GD2 son la misma construcción, opcionalmente en donde la expresión del IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, o una combinación de los mismos y la expresión del CAR están reguladas por la o las mismas secuencias reguladoras.
6. La célula de la reivindicación 1 o 3, en donde la construcción de expresión comprende un gen suicida inducible, opcionalmente en donde el gen suicida inducible es el gen suicida de caspasa-9 inducible.
- 20 7. La célula de la reivindicación 6, en donde el gen suicida inducible es timidina quinasa (sr39 TK).
8. La célula de la reivindicación 1, que comprende además una etiqueta CD34.
9. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la célula de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en un método para tratar un cáncer que comprende administrar la cantidad terapéuticamente efectiva de la célula de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes a un sujeto que lo necesita.
- 25 10. Las células de la reivindicación 9 para uso en el método, en donde la célula T asesina natural comprende un gen suicida inducible.
11. Las células de la reivindicación 9 para uso en el método, en donde el método comprende además inducir la eliminación de la célula T asesina natural administrada mediante la activación del gen suicida inducible.
- 30 12. Las células de la reivindicación 10 u 11 para uso en el método, en donde el gen suicida inducible es el gen suicida de caspasa-9 inducible, opcionalmente en donde el método comprende además administrar AP20187, AP1903, o una mezcla de los mismos al sujeto para activar el gen suicida de caspasa-9 inducible.
13. Las células de la reivindicación 10 u 11 para uso en el método, en donde el gen suicida inducible es timidina quinasa (sr39 TK), opcionalmente en donde el método comprende además administrar ganciclovir al sujeto para activar la timidina quinasa.
- 35 14. Las células de la reivindicación 9 para uso en el método, en donde la célula T asesina natural comprende una etiqueta CD34.
15. Las células de la reivindicación 9 para uso en el método, en donde el cáncer es un tumor, opcionalmente
 - (i) en donde el microentorno tumoral es hipóxico;
 - (ii) en donde el microentorno tumoral comprende menos del 15 % de O₂, menos del 10 % de O₂, menos del 5 % de O₂, menos del 4 % de O₂, menos del 3 % de O₂, menos del 2 % de O₂ o menos del 1 % de O₂; o
 - 40 (iii) en donde el método comprende administrar la célula T asesina natural localmente en el tumor.
16. Las células de la reivindicación 9 para uso en el método, en donde:
 - (i) el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer endometrial, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de próstata, tumores hematopoyéticos del linaje linfoide, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, leucemia mieloide, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica, cáncer de tiroides, cáncer de tiroides folicular, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimal, fibrosarcoma, rhabdomyosarcomas,
 - 45

- melanoma, melanoma uveal, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, tumor benigno de la piel, cáncer renal, linfoma de células grandes anaplásico, carcinoma de células escamosas del esófago, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células dendríticas folicular, cáncer intestinal, cáncer invasivo muscular, tumor de la vesícula seminal, carcinoma epidérmico, cáncer de bazo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de la retina, cáncer biliar, cáncer del intestino delgado, cáncer de las glándulas salivares, cáncer de útero, cáncer de testículos, cáncer de tejido conectivo, hipertrofia prostática, mielodisplasia, macroglobulinemia de Waldenstrom, nasofaríngeo, cáncer neuroendocrino, síndrome mielodisplásico, mesotelioma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, carcinoide, esofágico-gástrico, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer peritoneal, cáncer mulleriano seroso papilar, ascitis maligna, tumor estromal gastrointestinal (GIST), y un síndrome de cáncer hereditario seleccionado de síndrome de Li-Fraumeni y síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL);
- 5 (ii) el cáncer es neuroblastoma;
- 10 (iii) la célula T asesina natural deriva de células del sujeto;
- (iv) la administración es sistémica;
- (v) la administración es parenteral; o
- 15 (vi) el método comprende además administrar una o más terapias para el cáncer al sujeto.

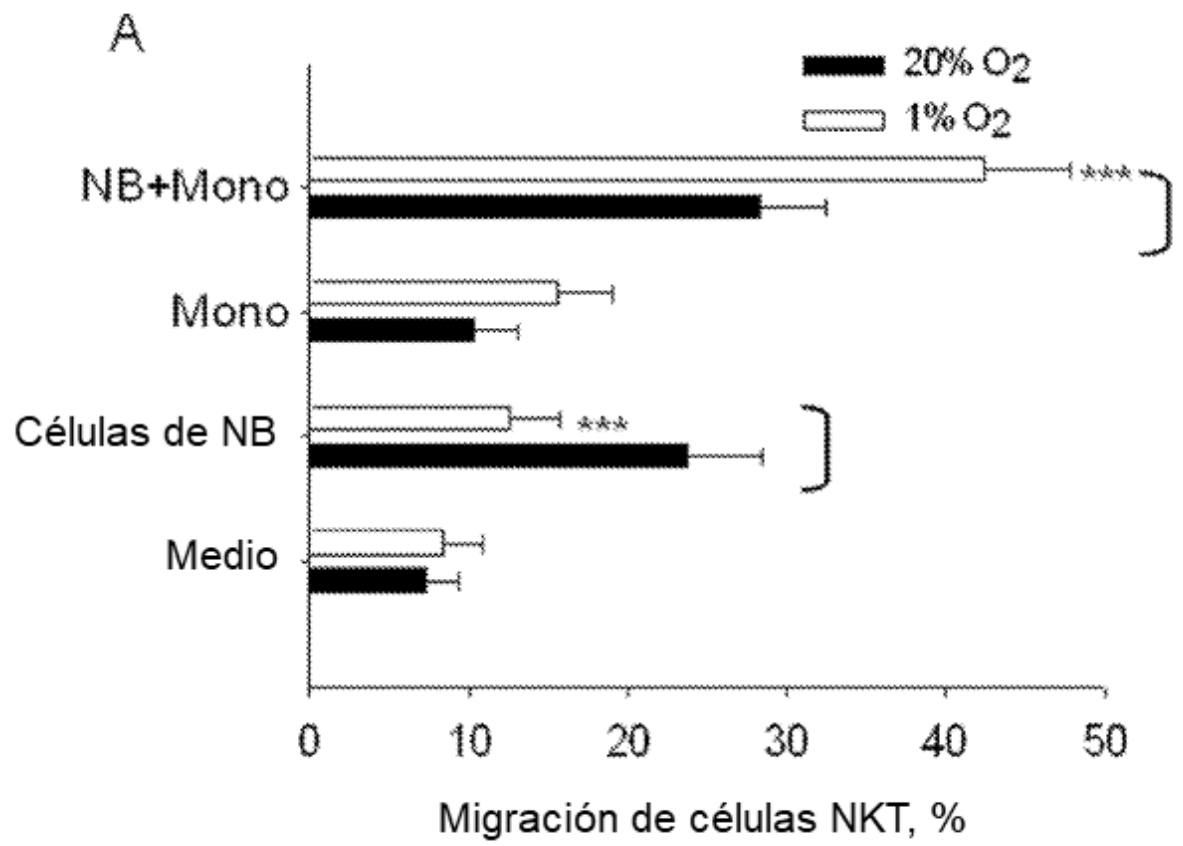


FIG. 1

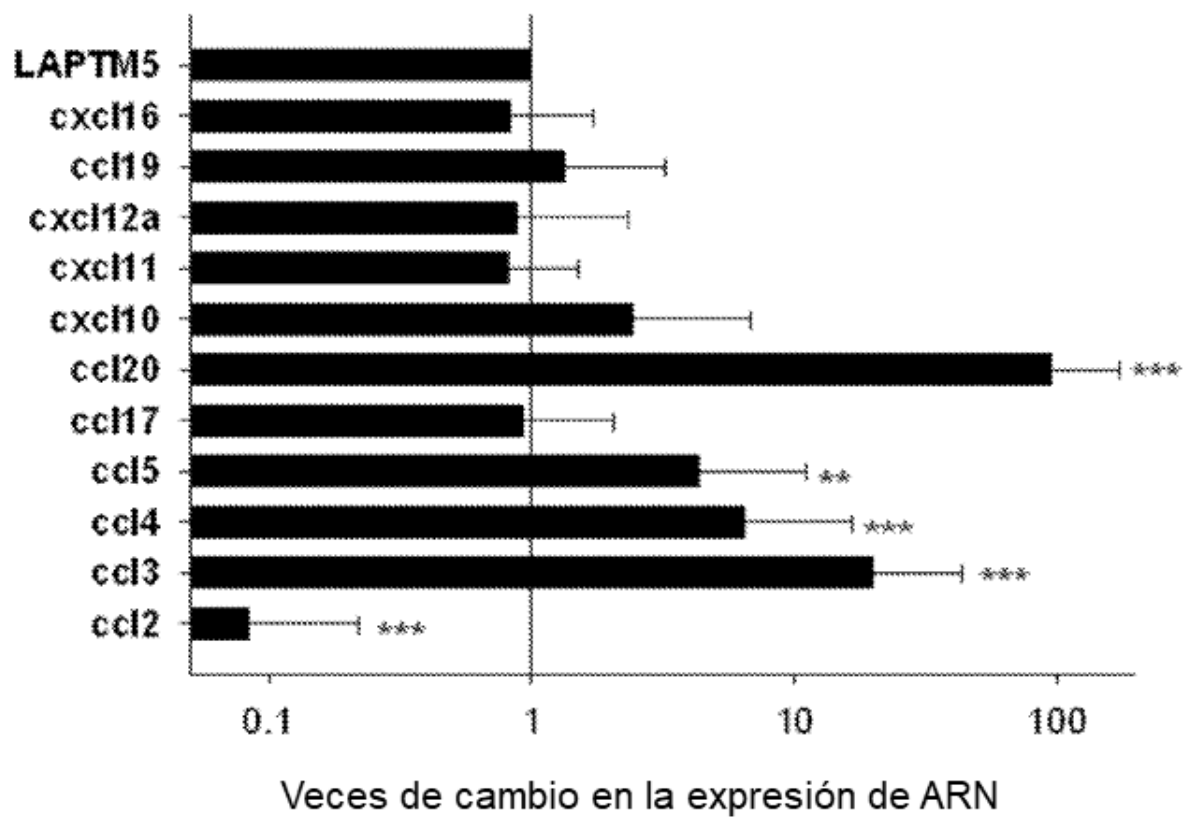
B

FIG. 1

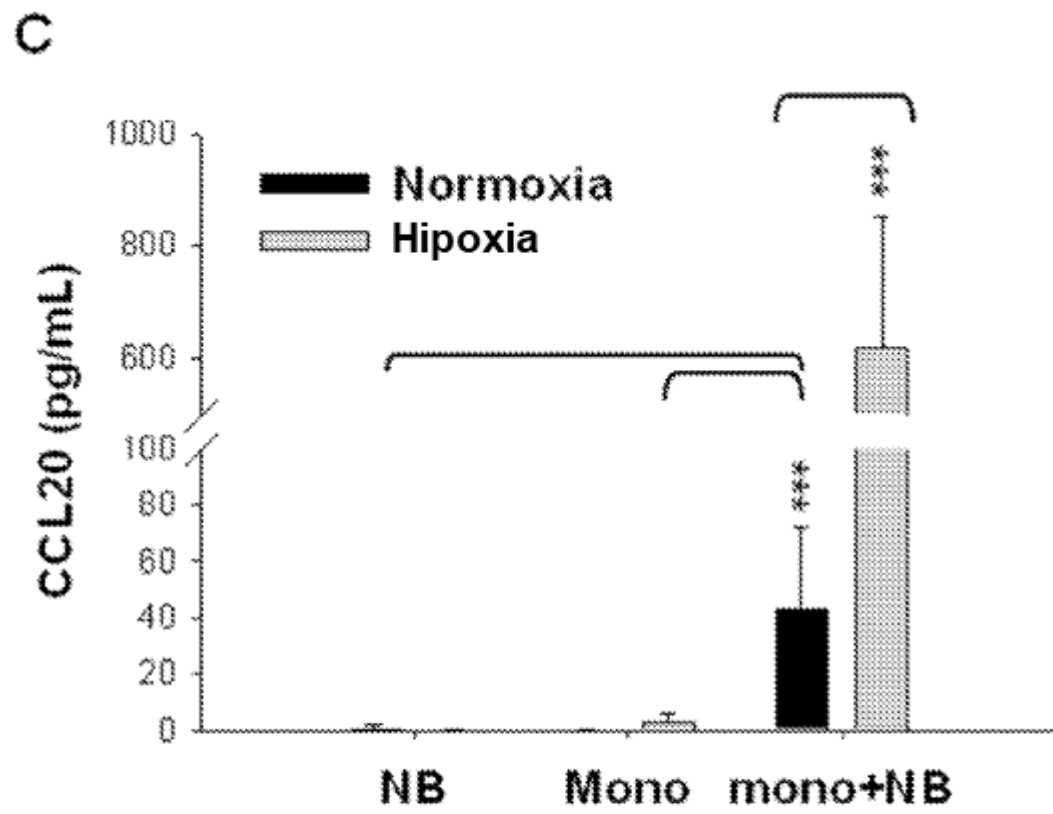


FIG. 1

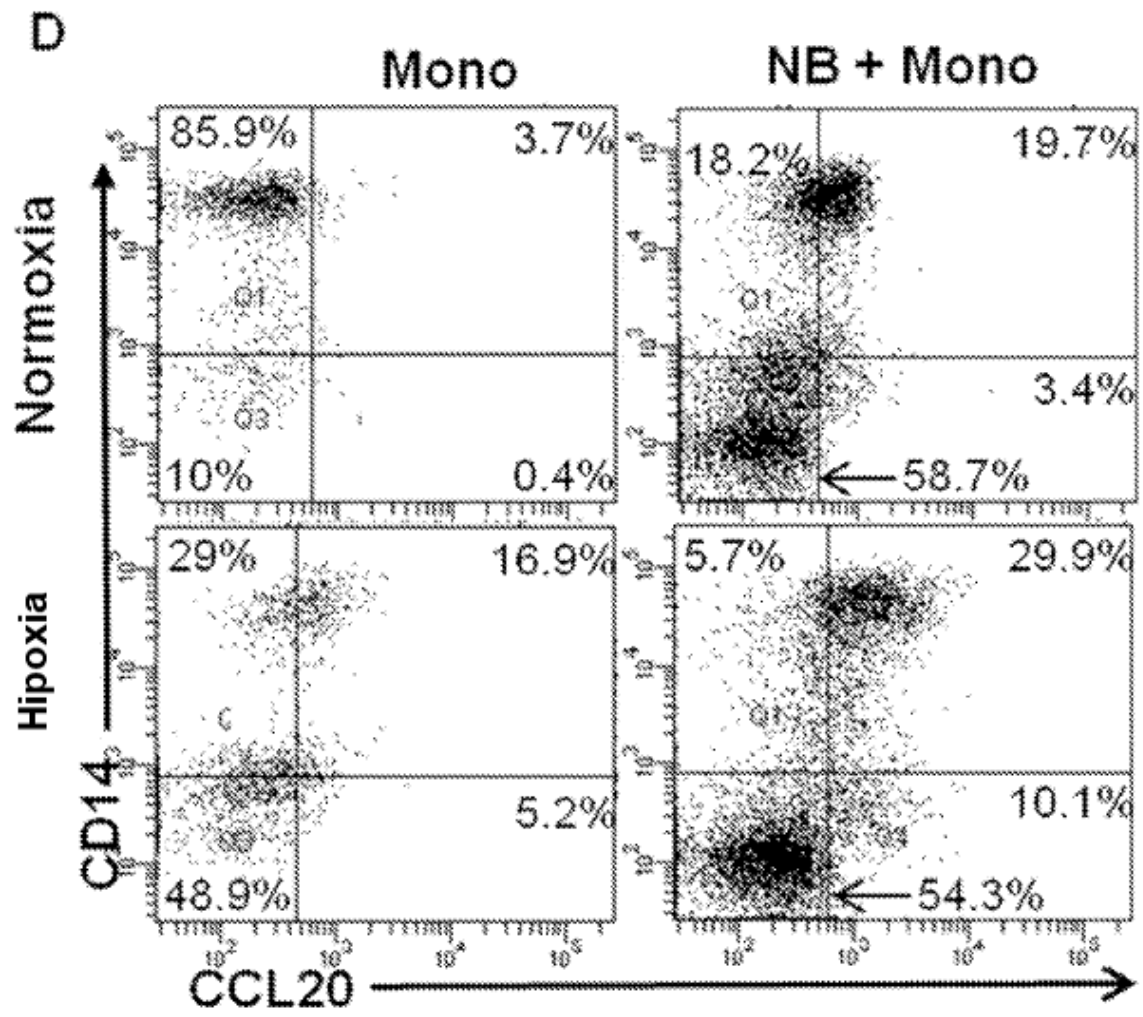


FIG. 1

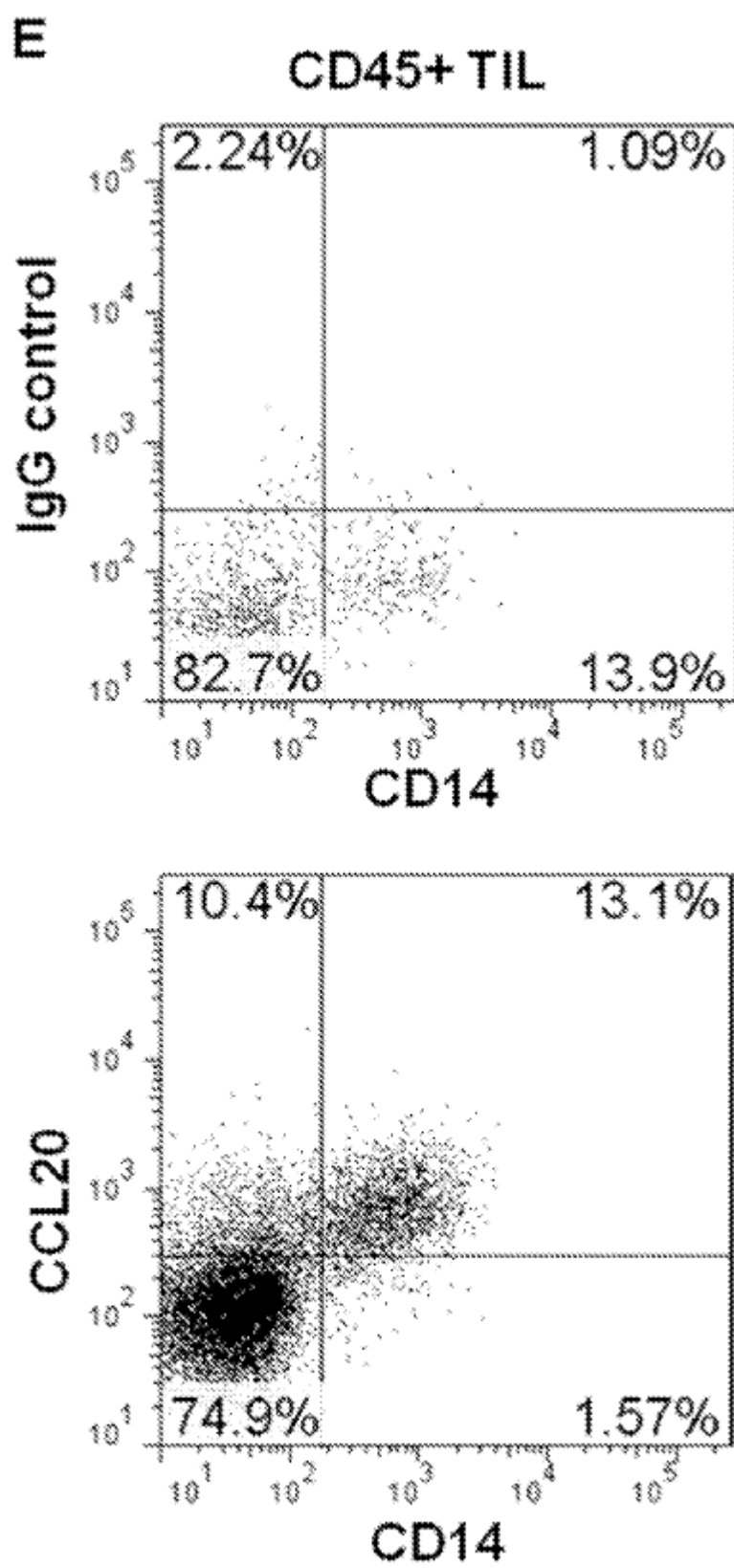


FIG. 1

A

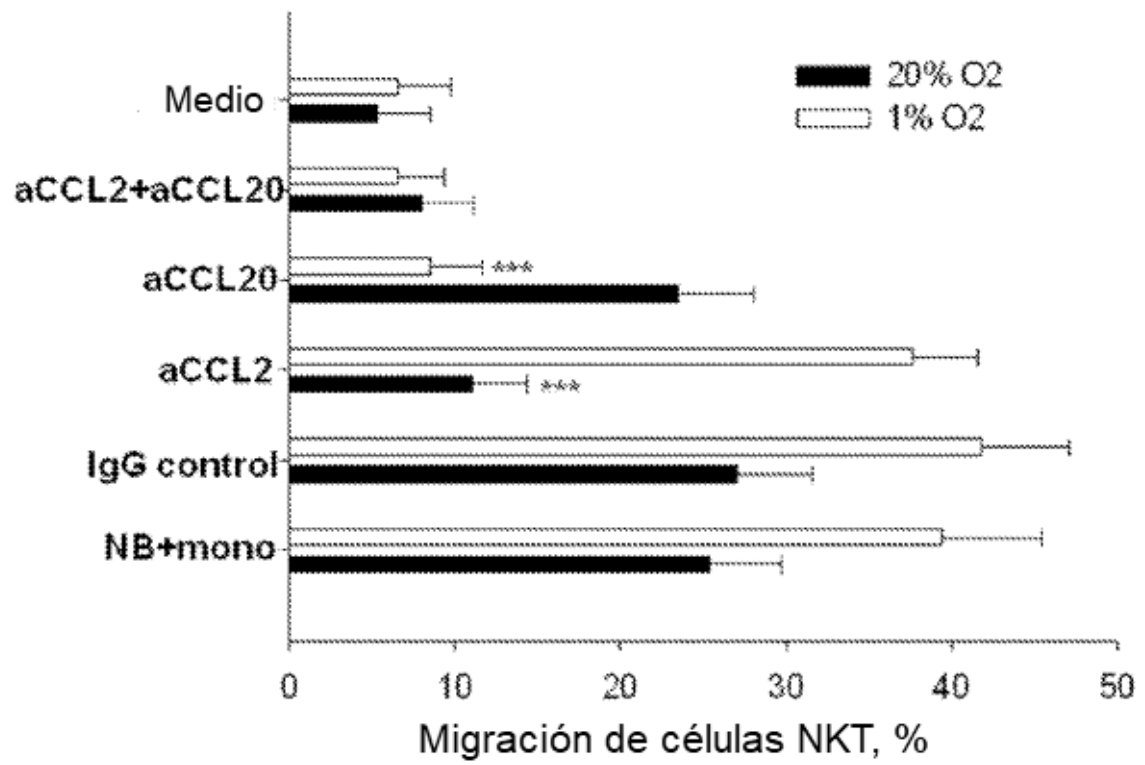


FIG. 2

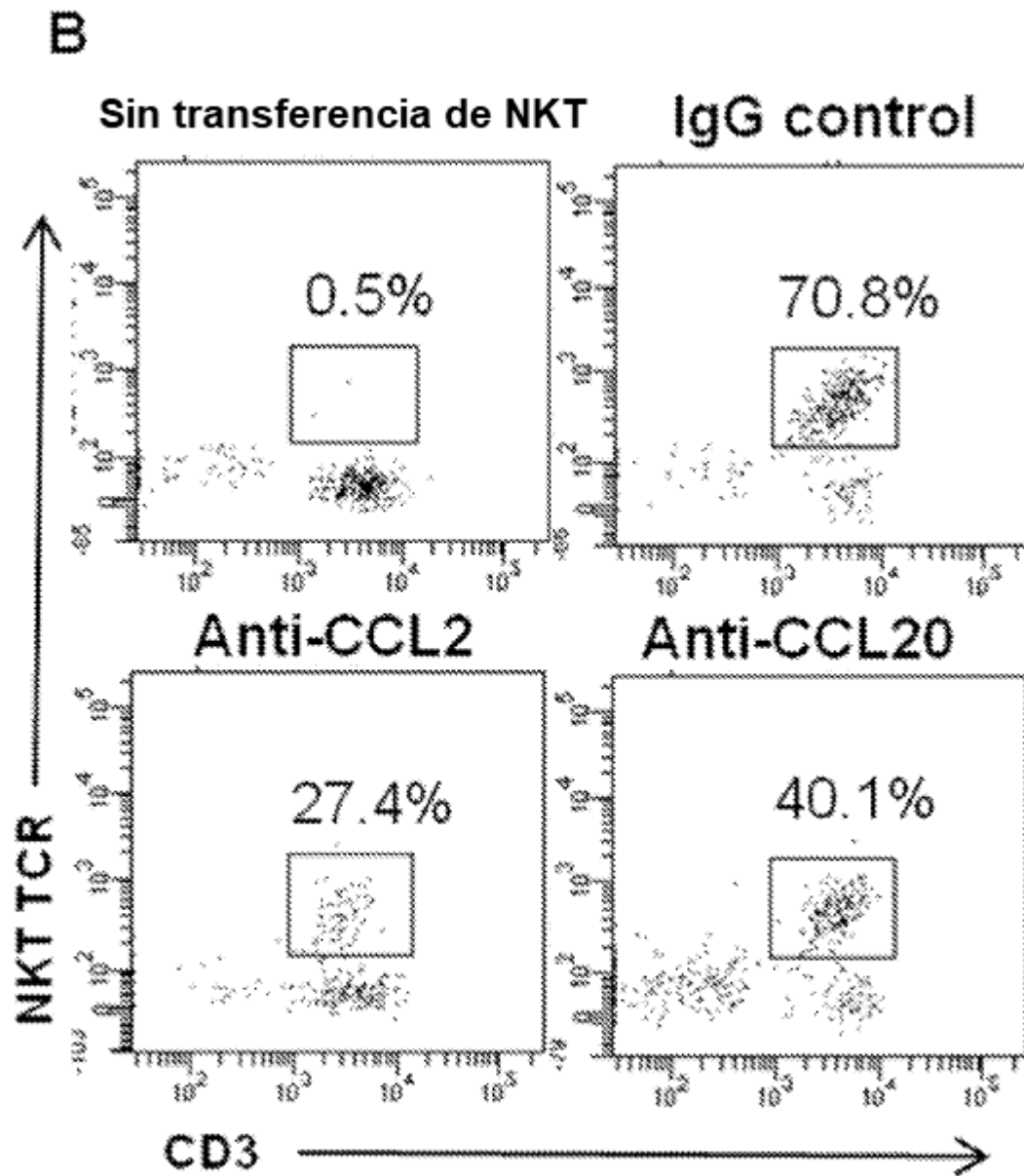


FIG. 2

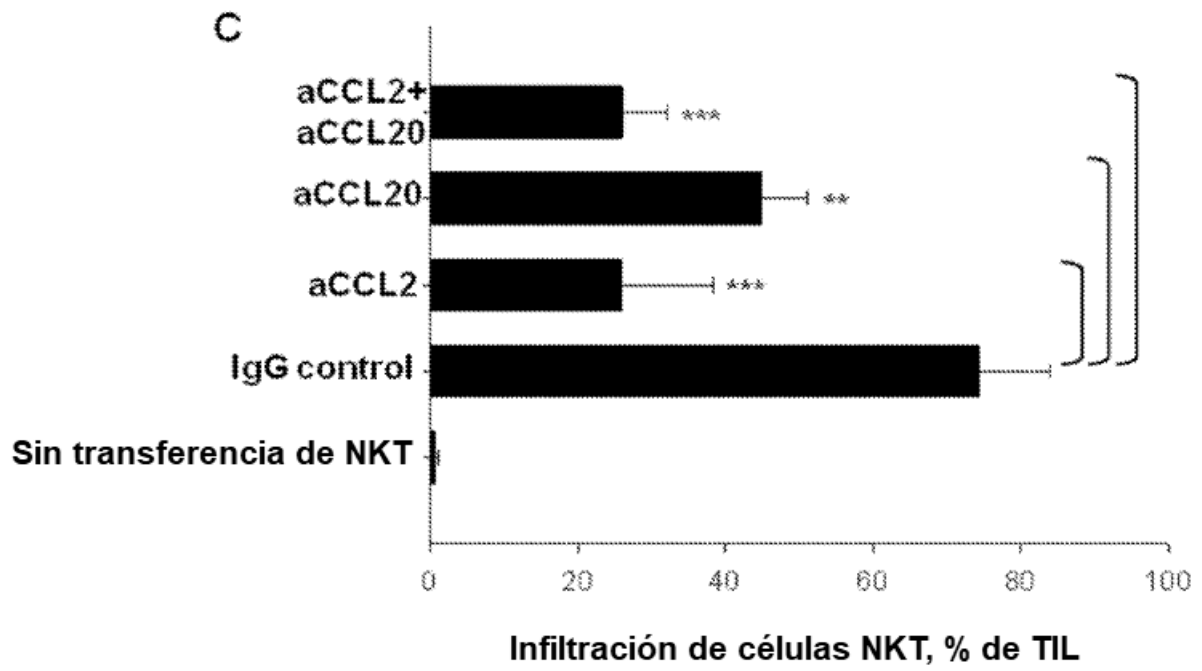


FIG. 2

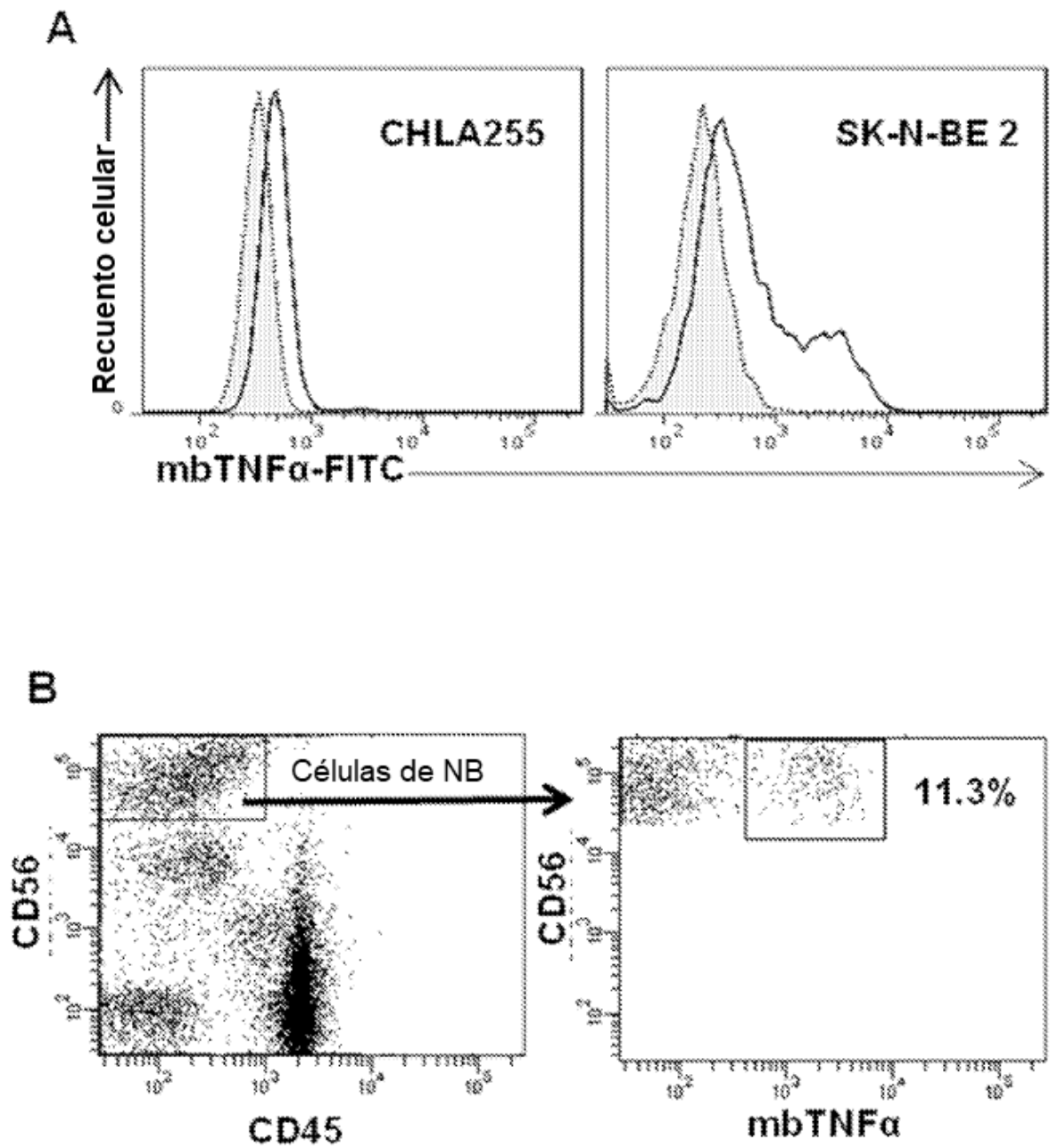


FIG. 3

C

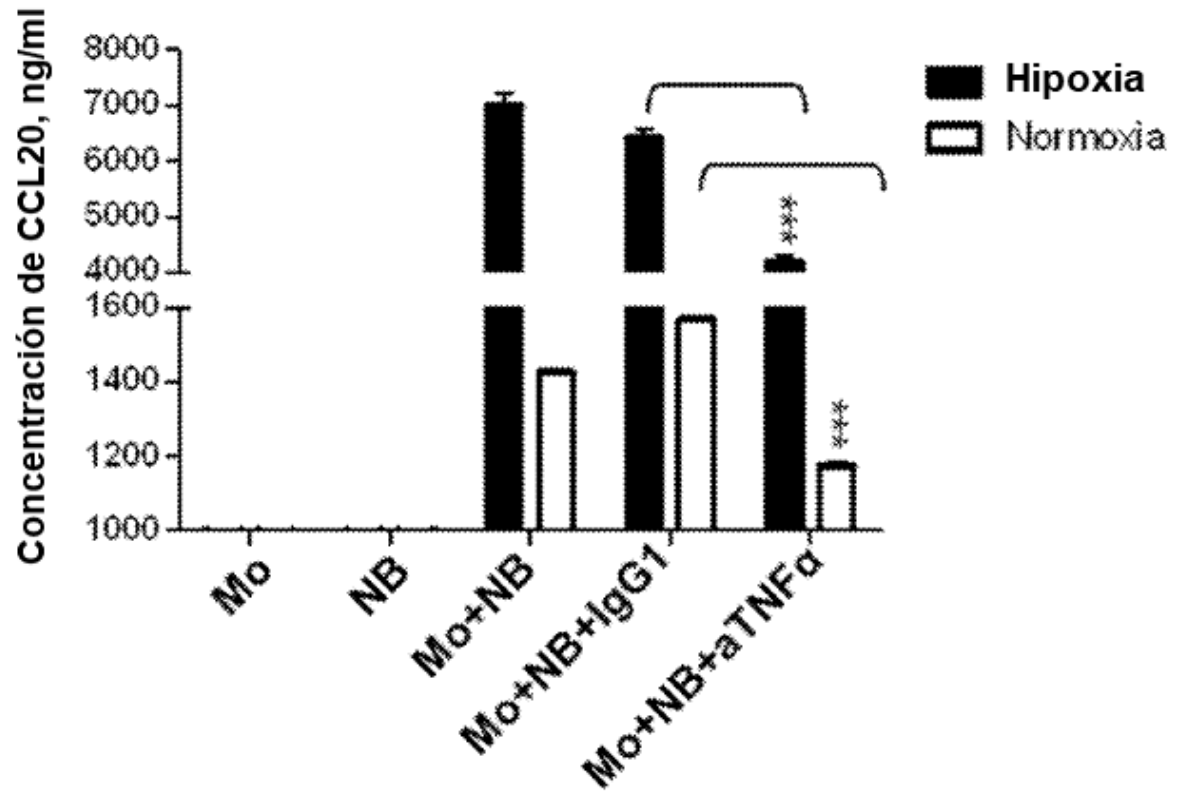


FIG. 3

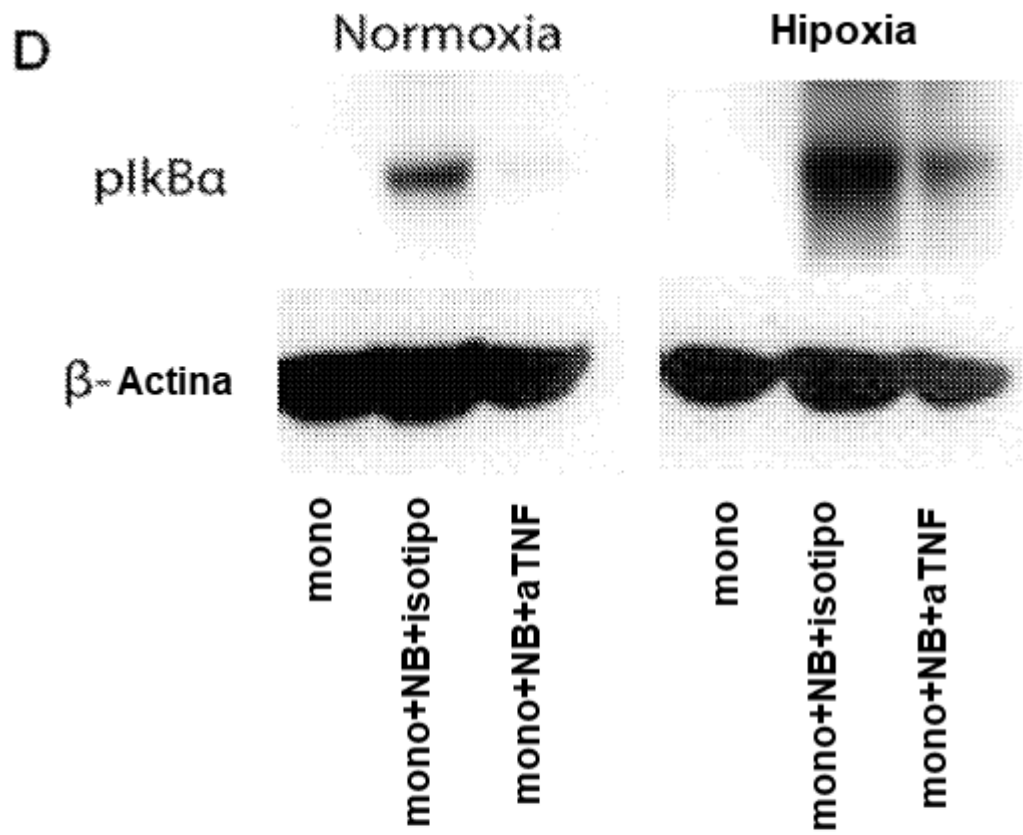


FIG. 3

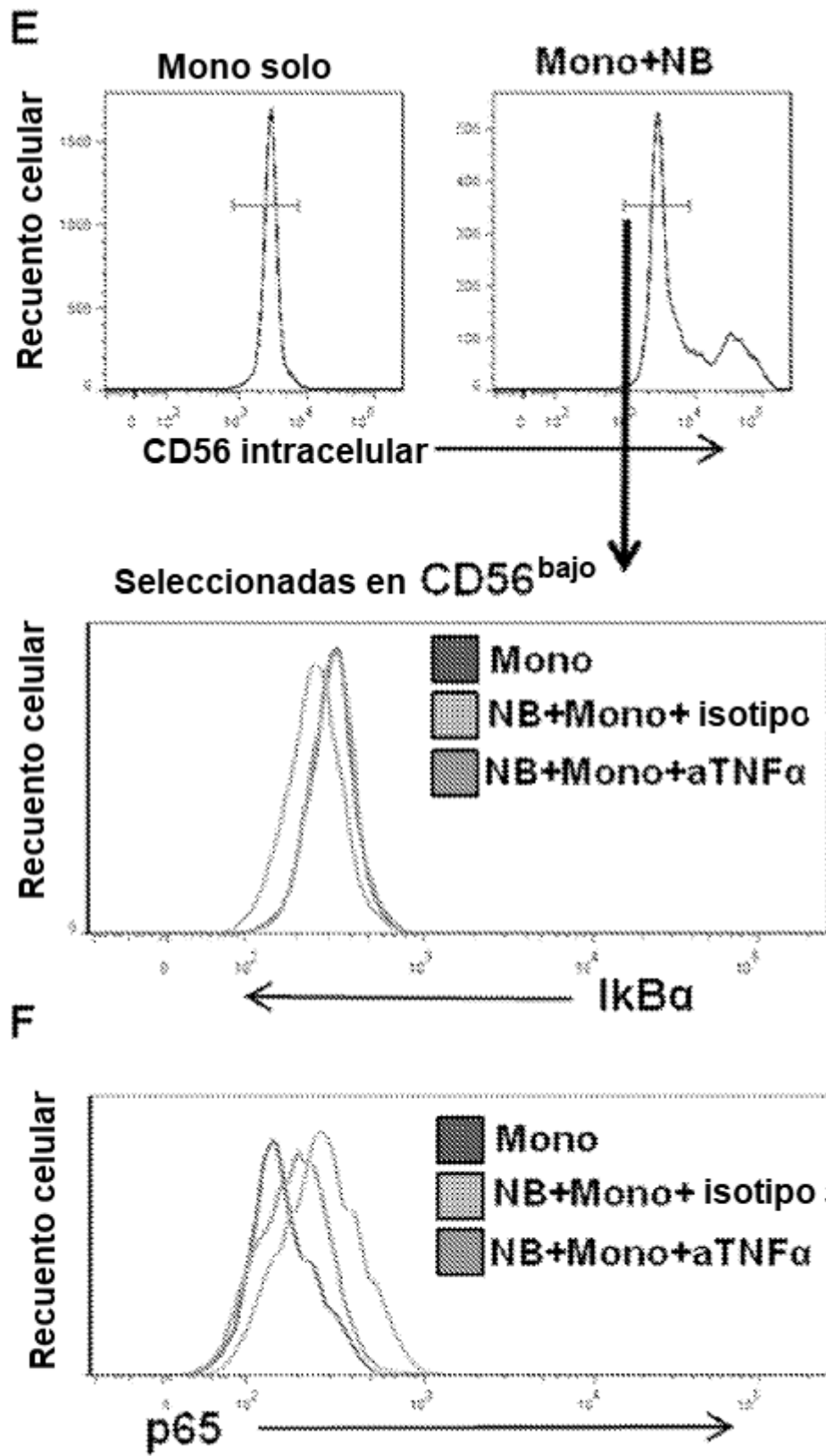


FIG. 3

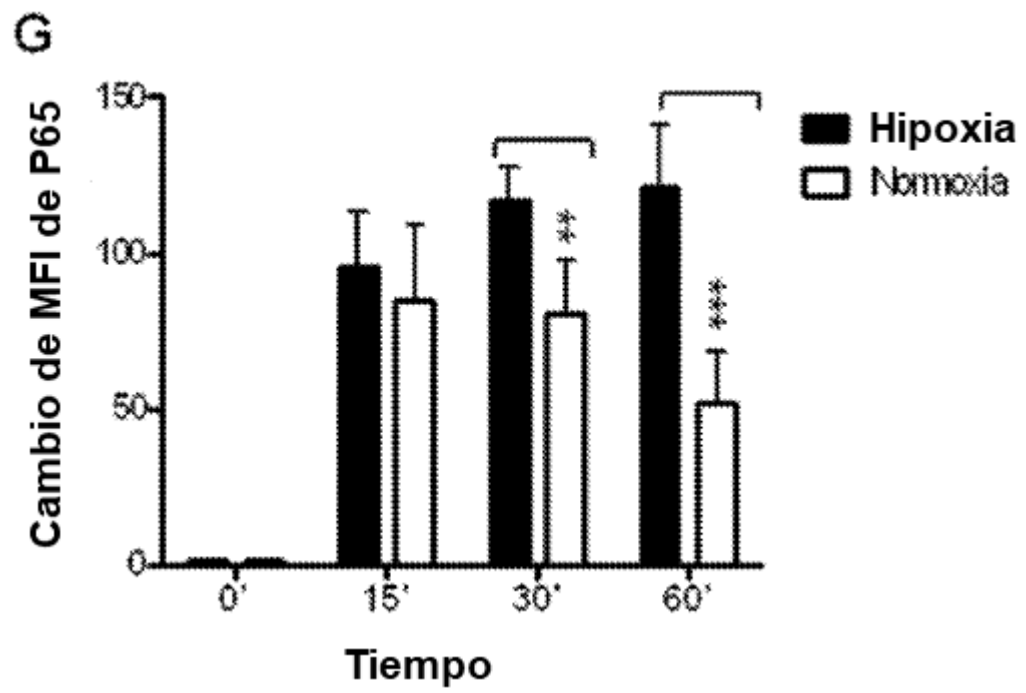


FIG. 3

A

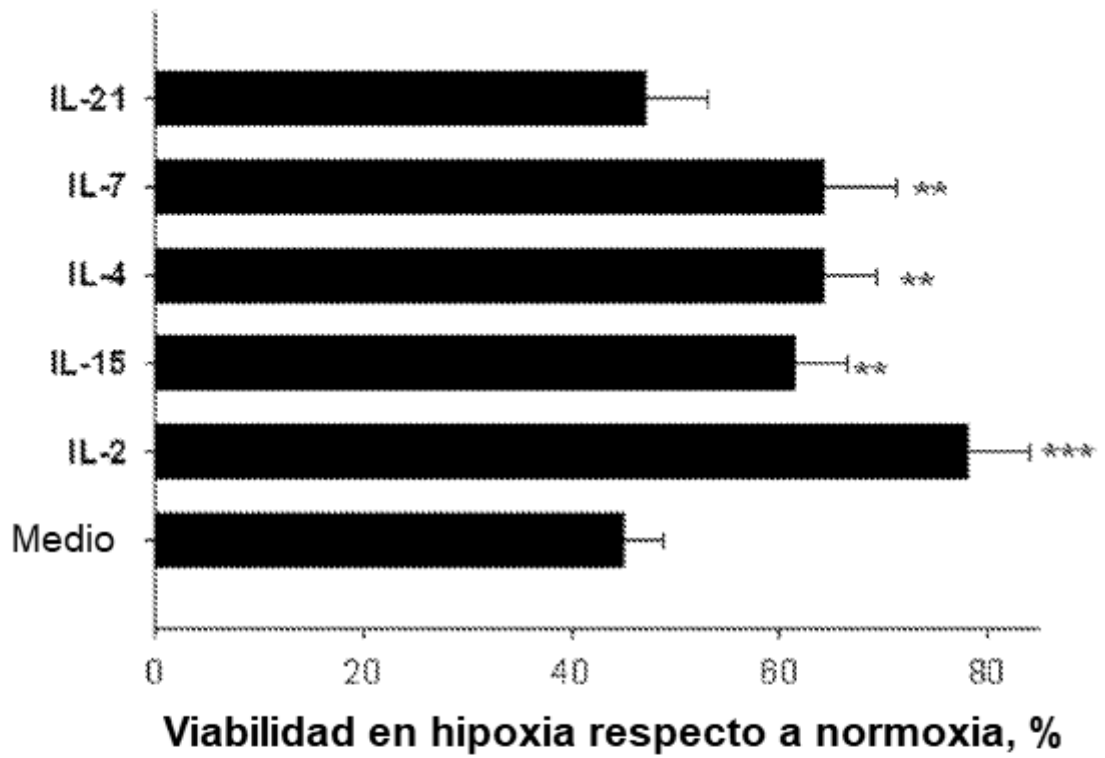


FIG. 4

B

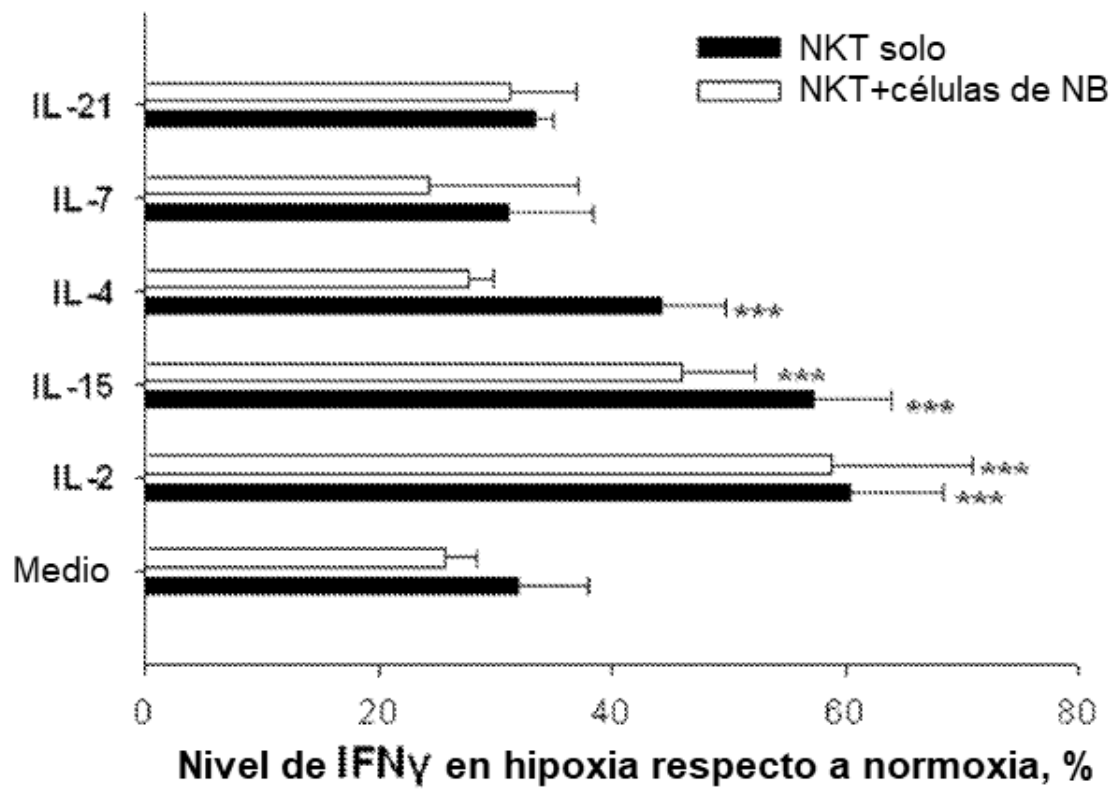


FIG. 4

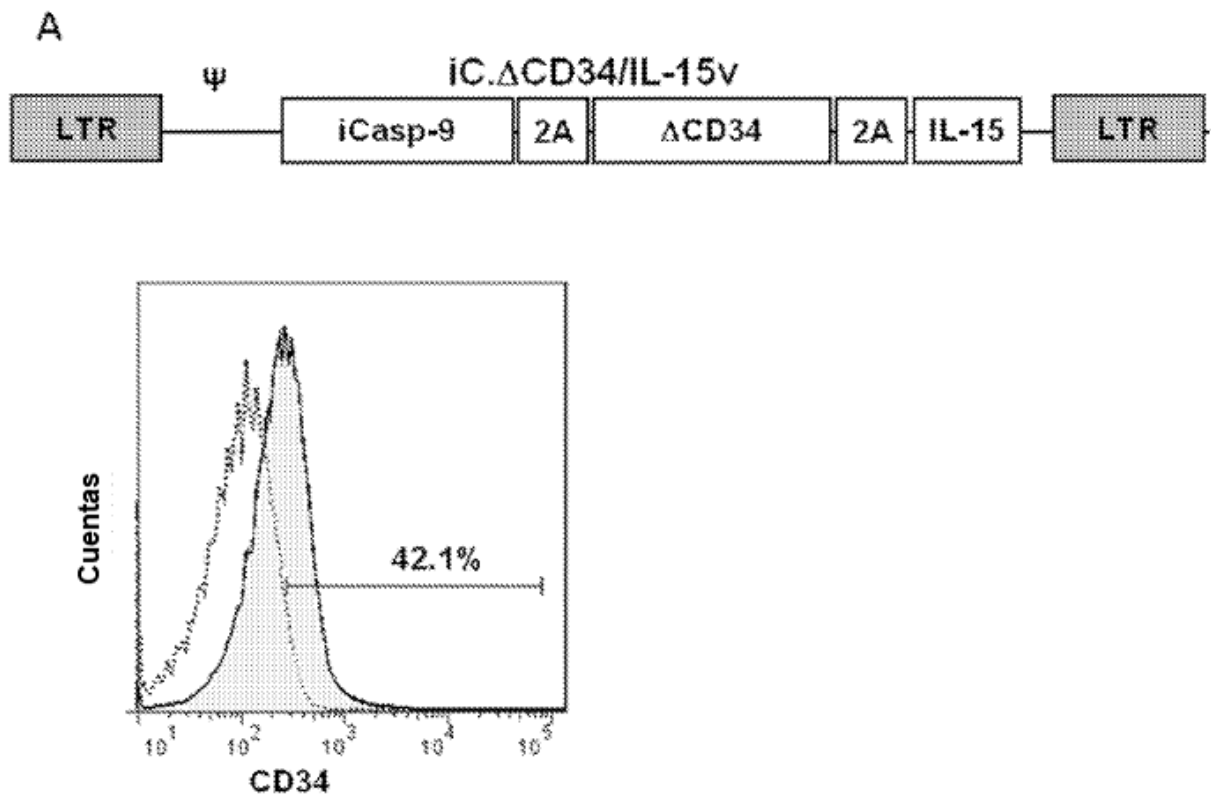


FIG. 5

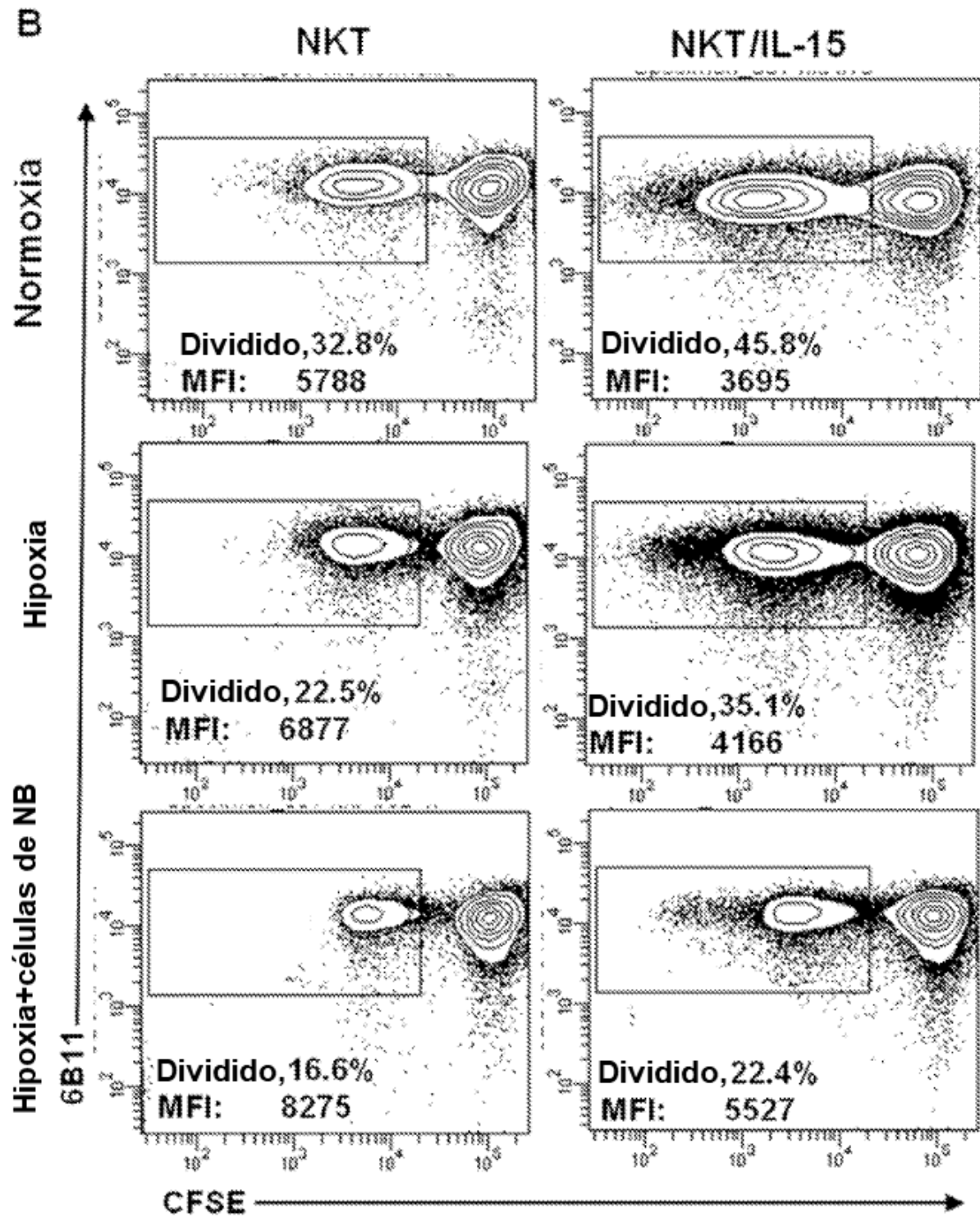


FIG. 5

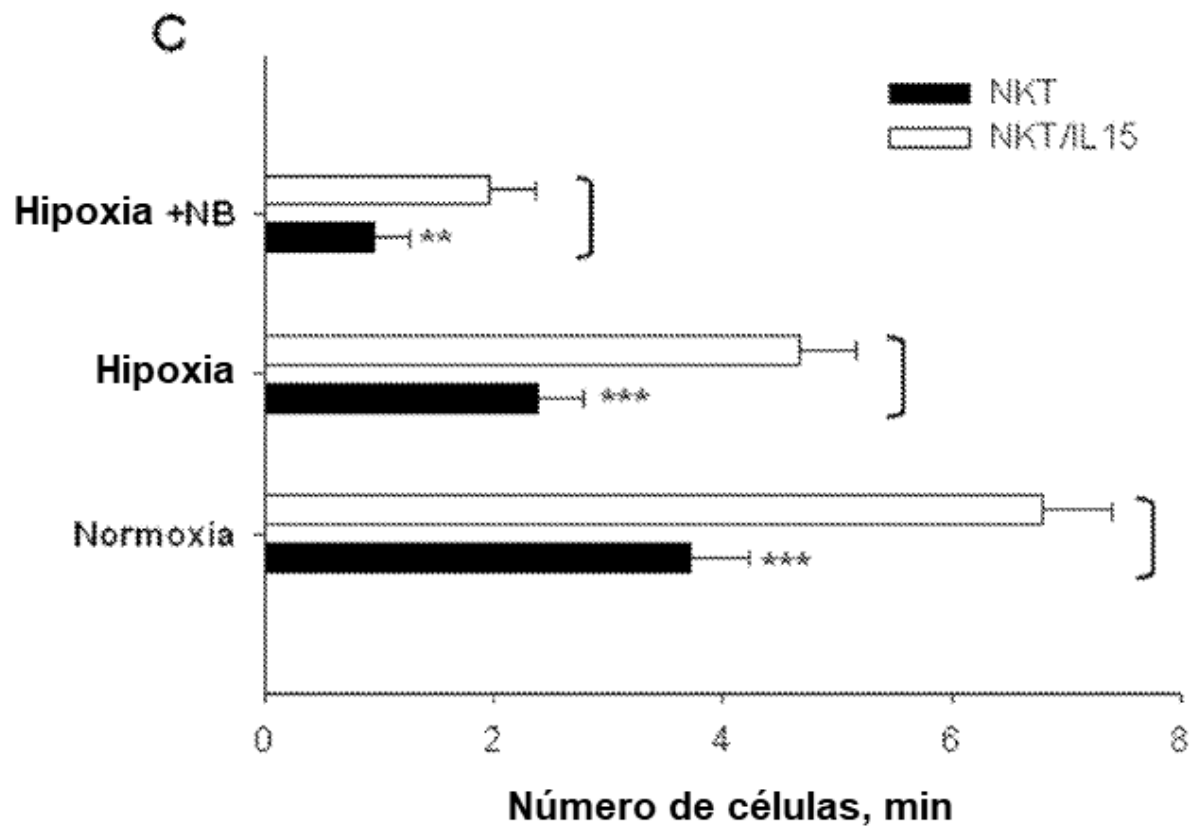


FIG. 5

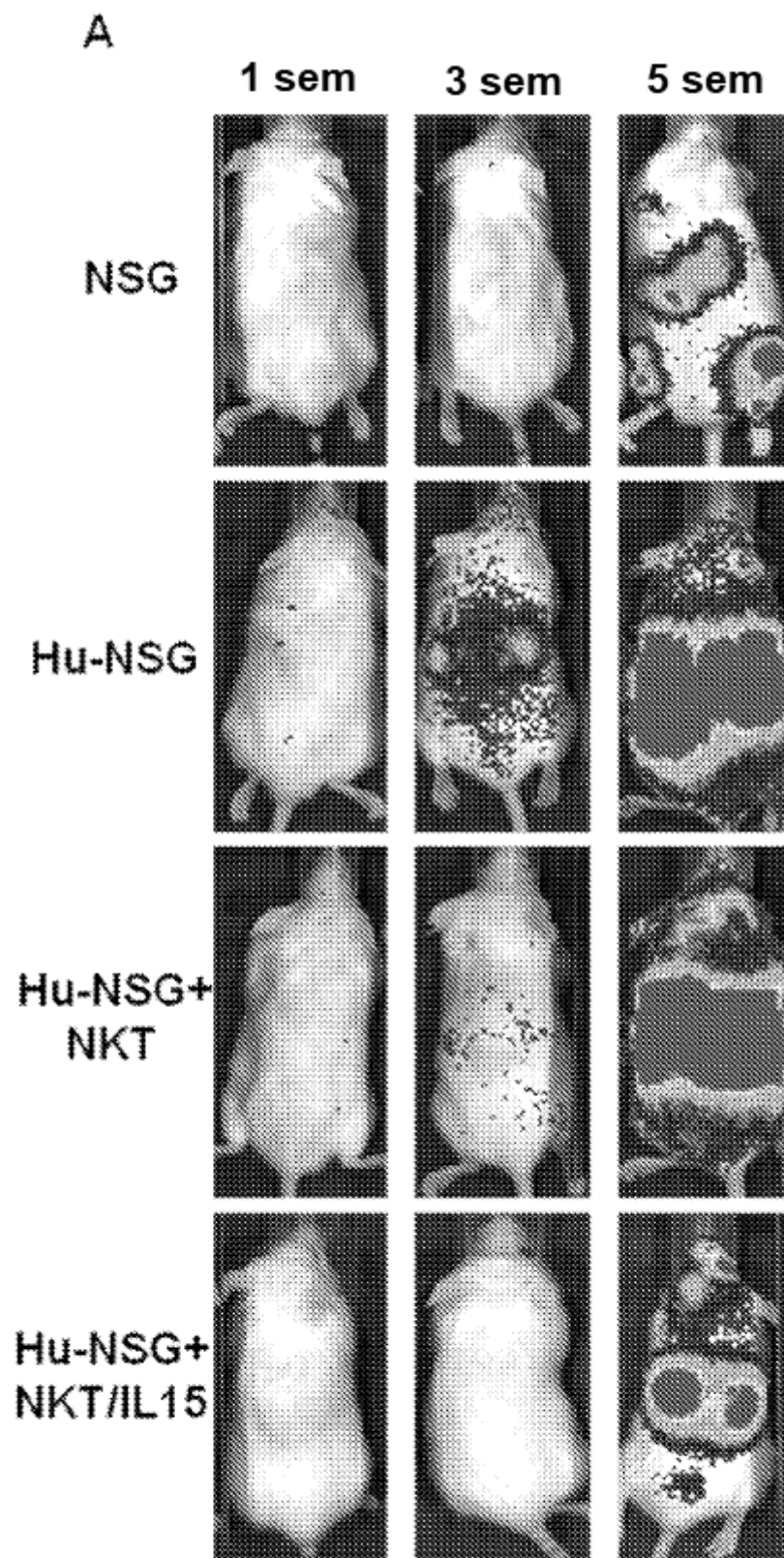


FIG. 6

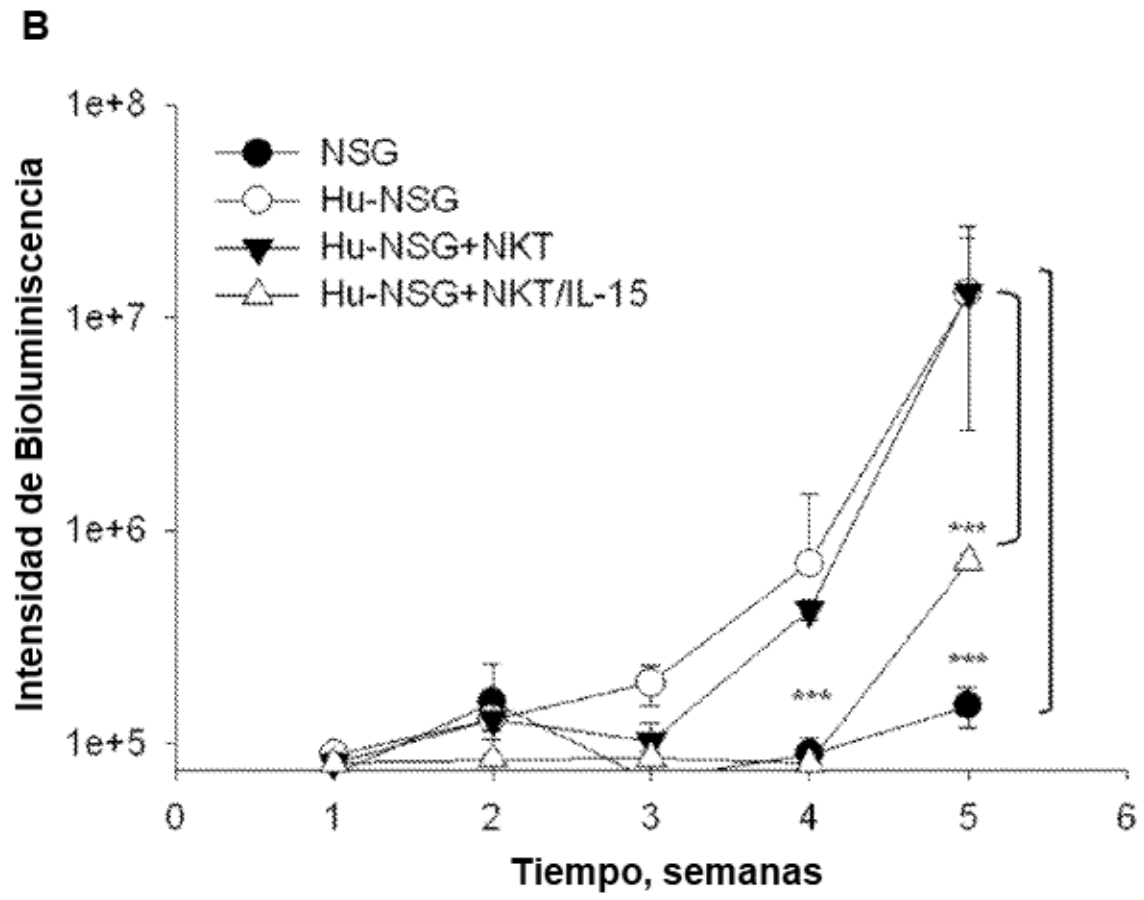


FIG. 6

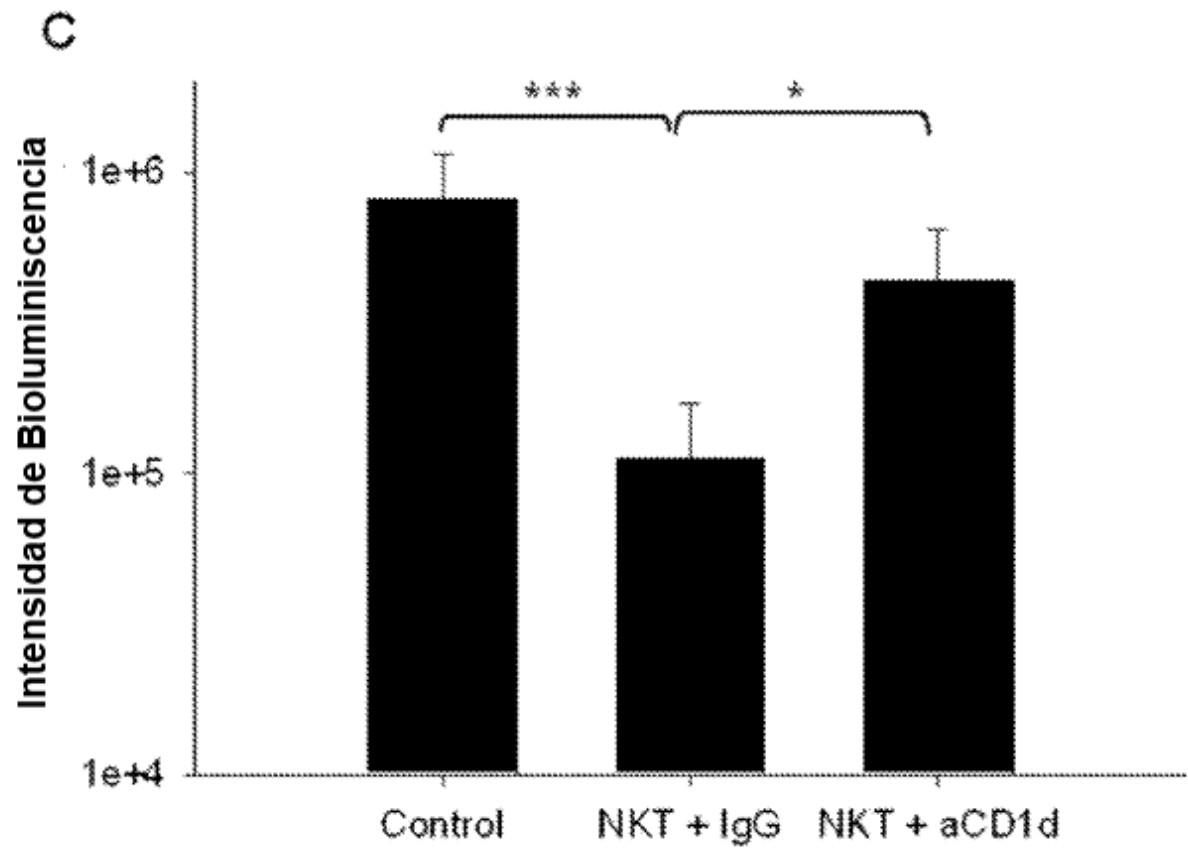


FIG. 6

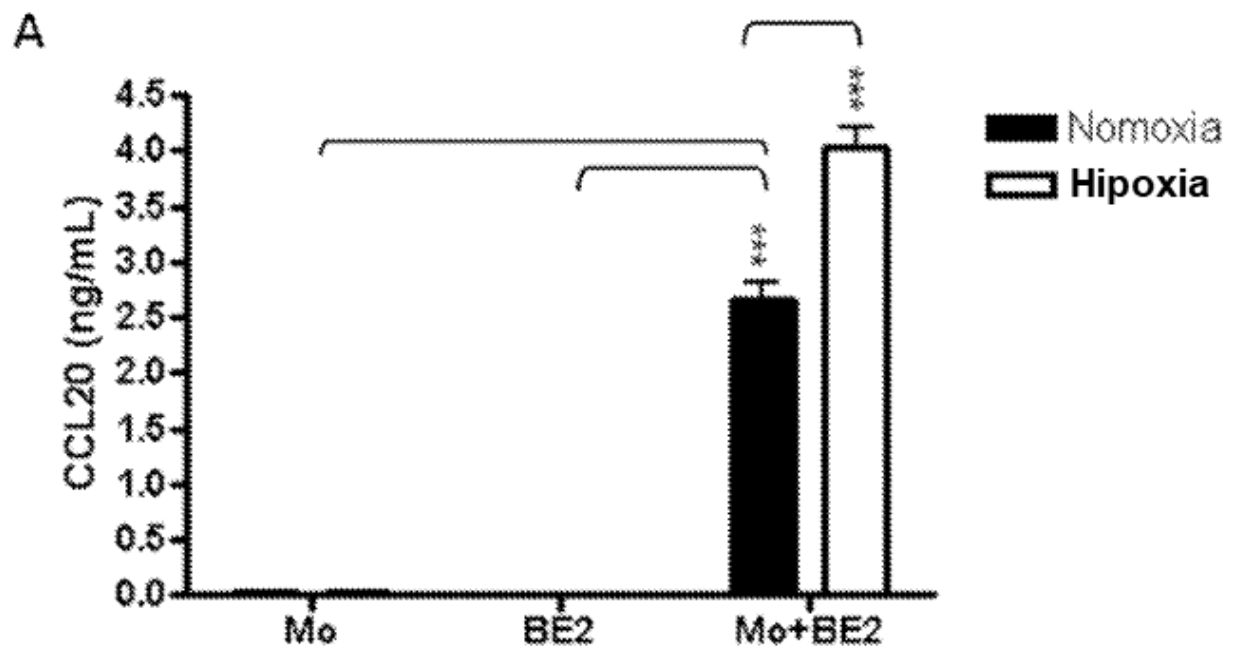


FIG. 7

B

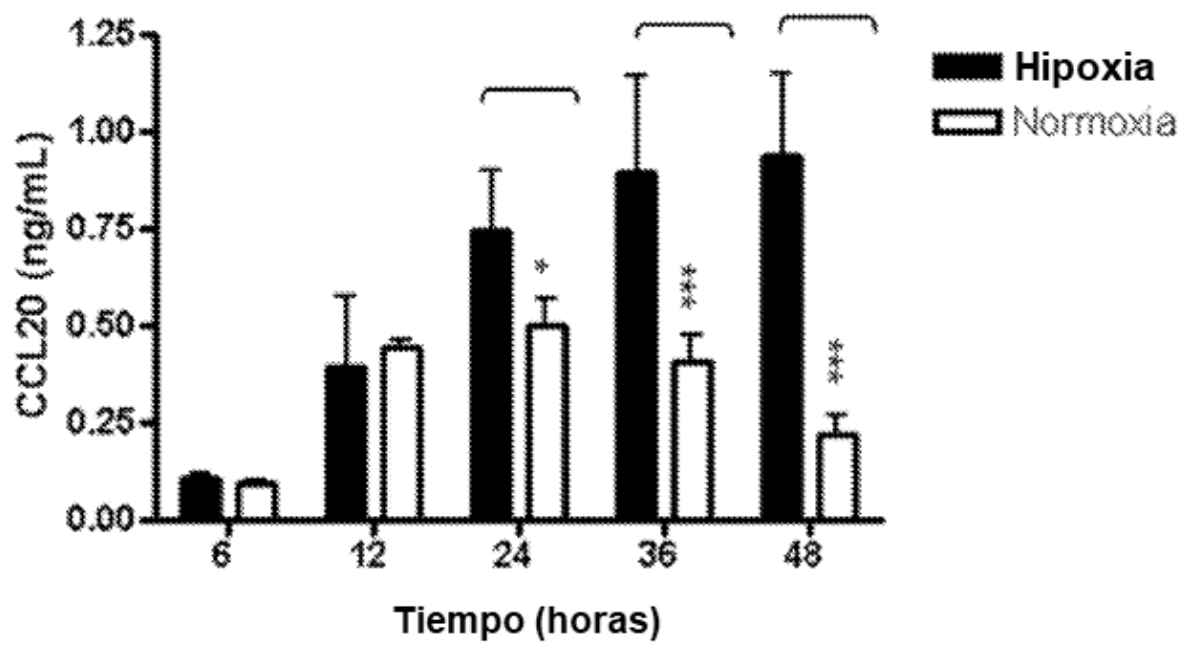


FIG. 7

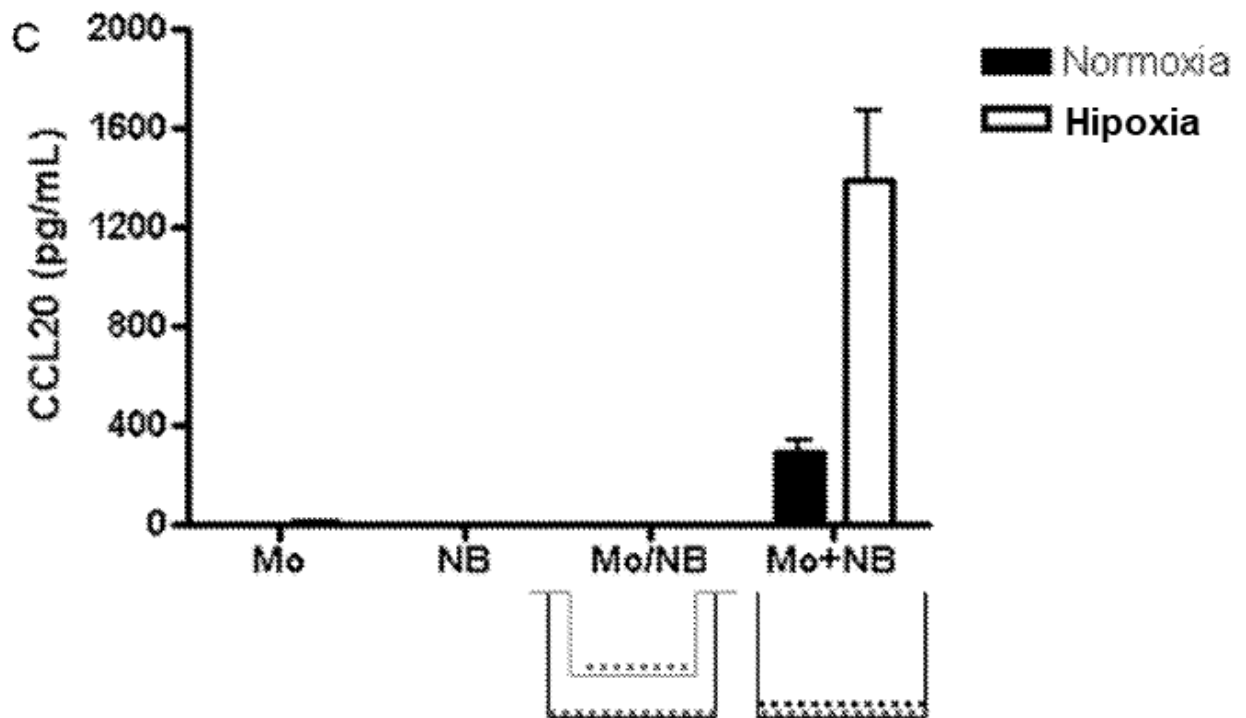


FIG. 7

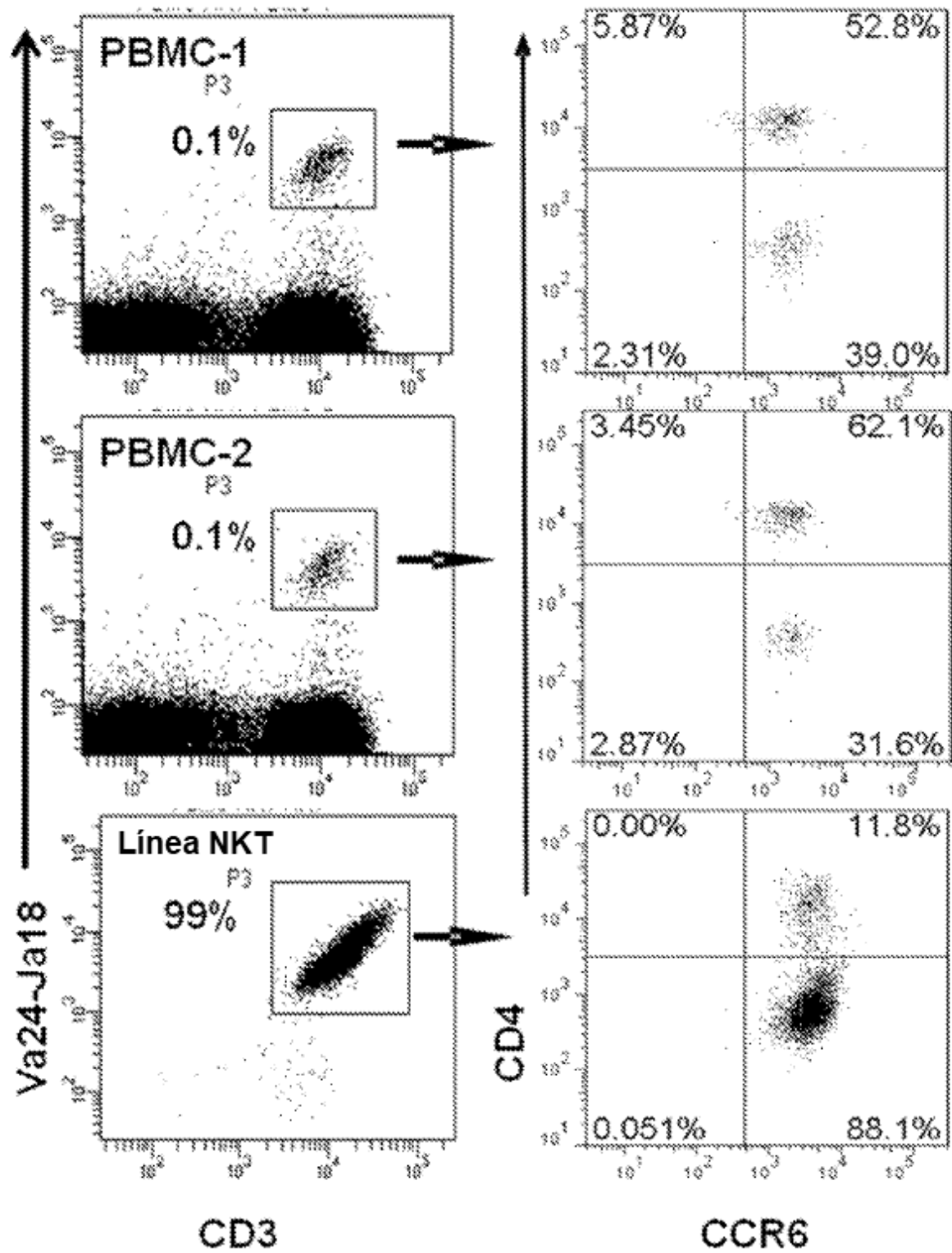


FIG. 8

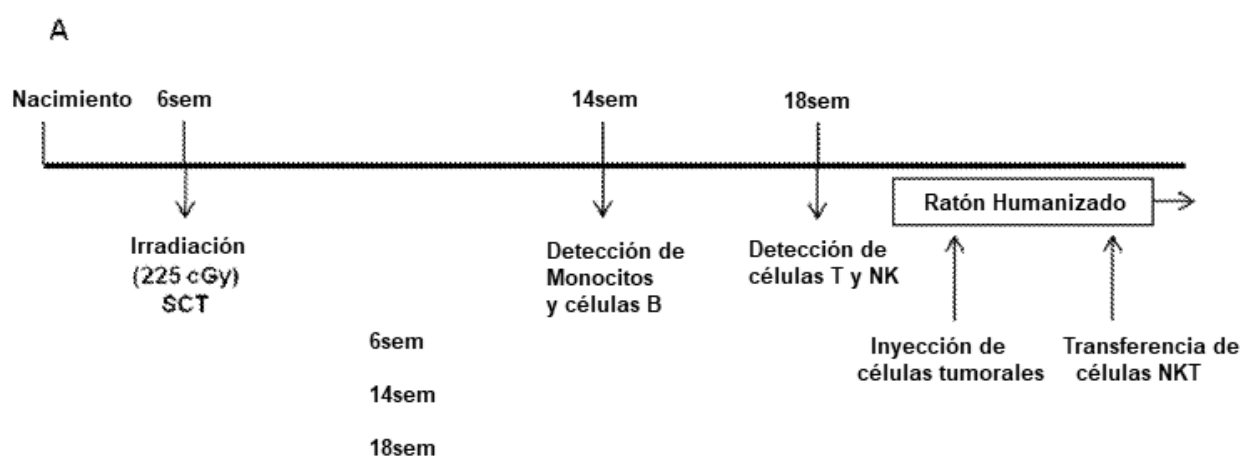


FIG. 9

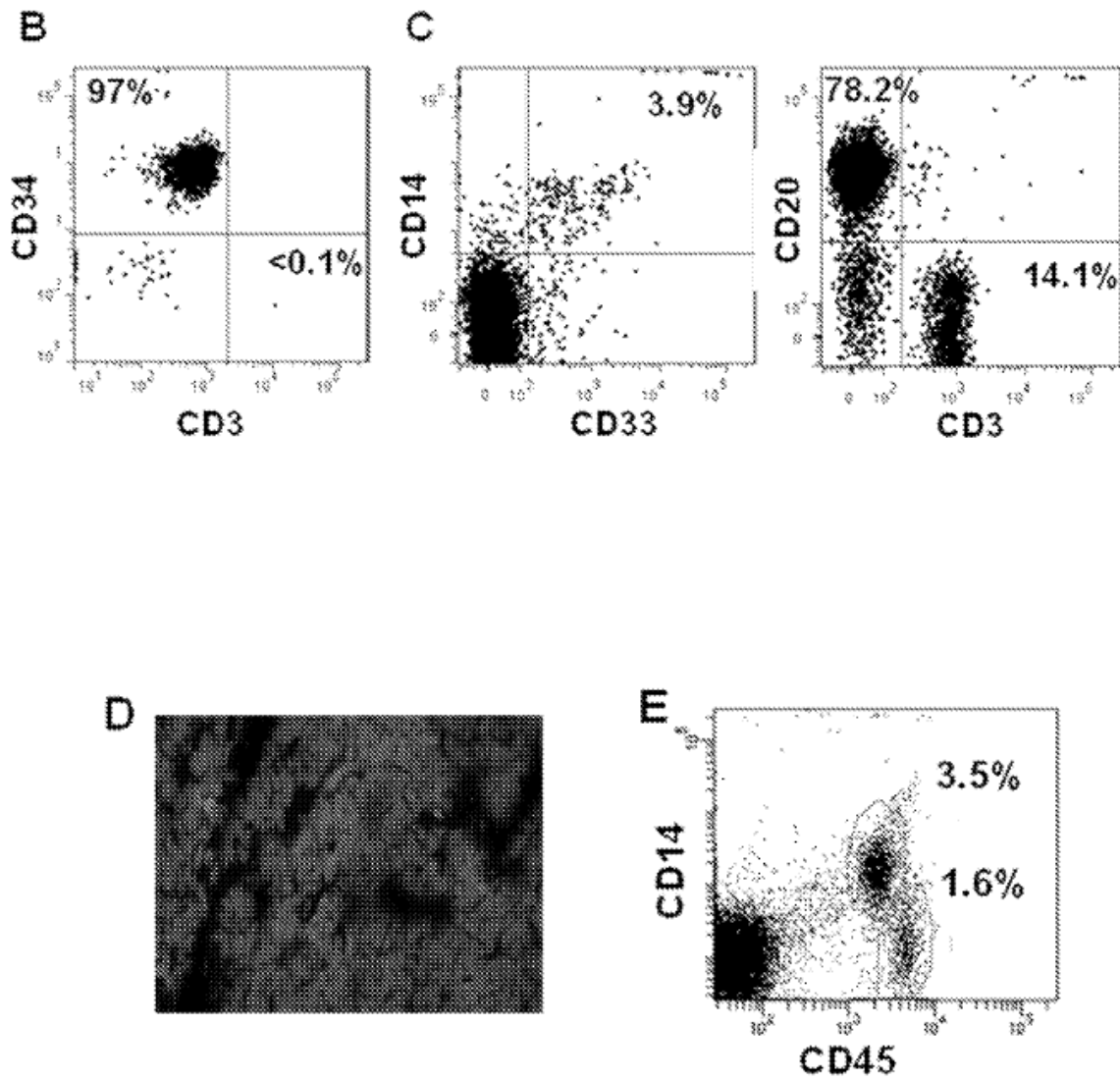


FIG. 9

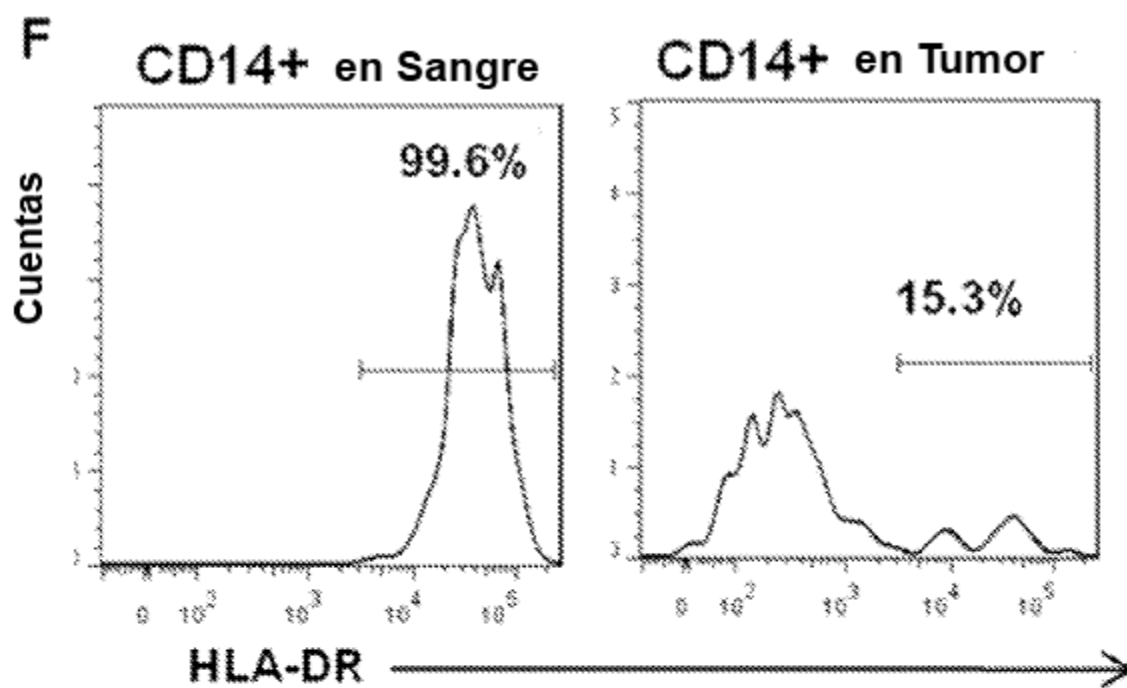


FIG. 9

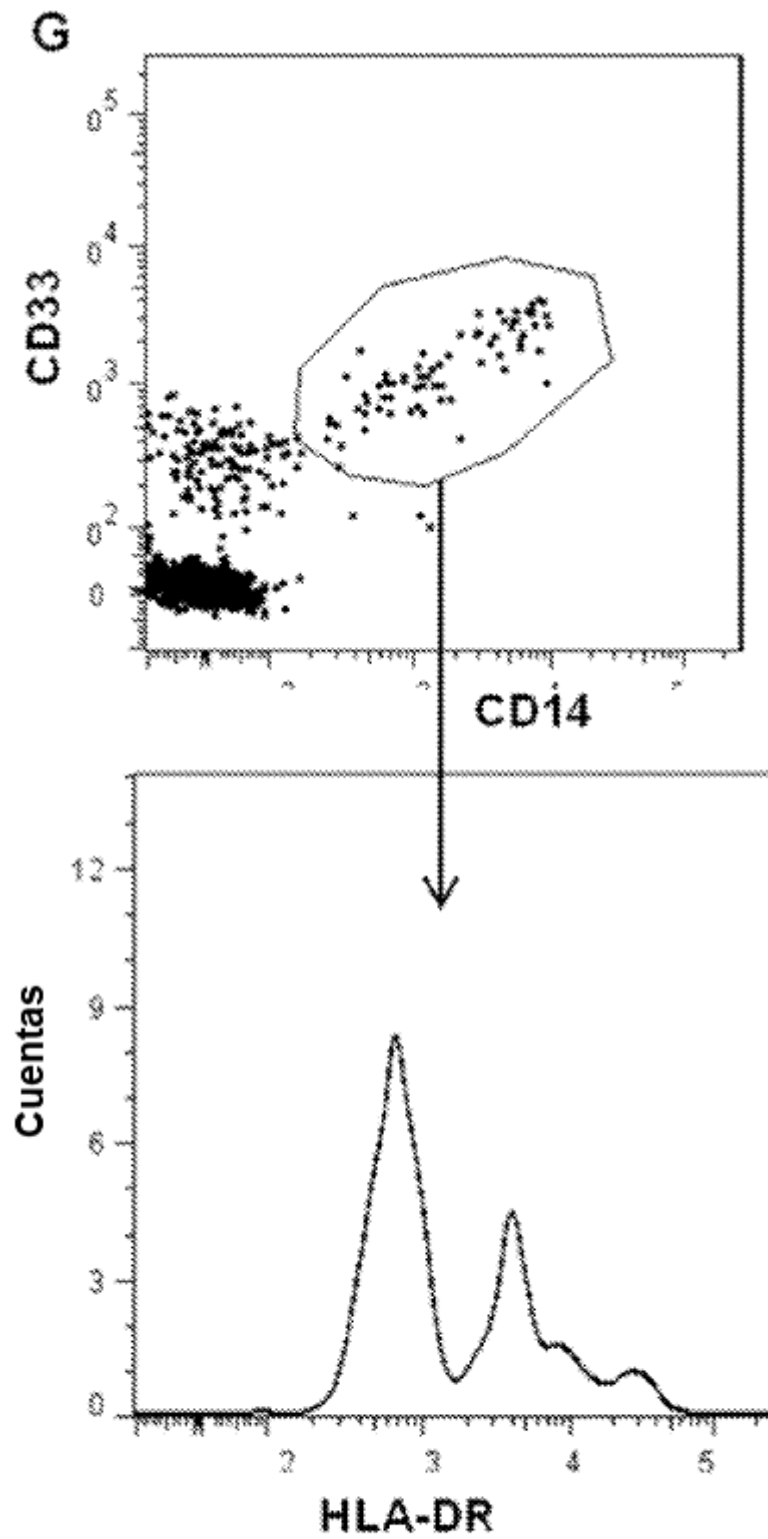


FIG. 9

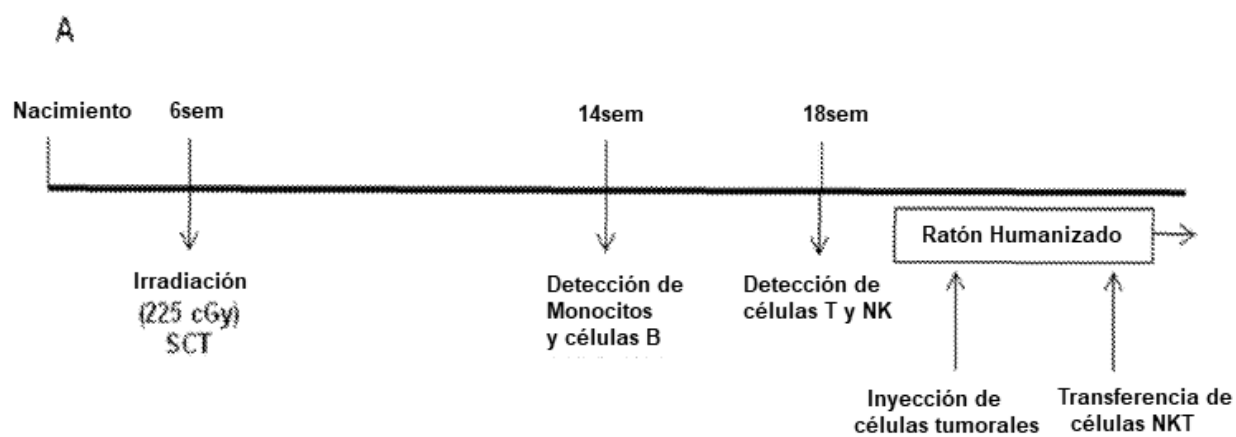


FIG. 10

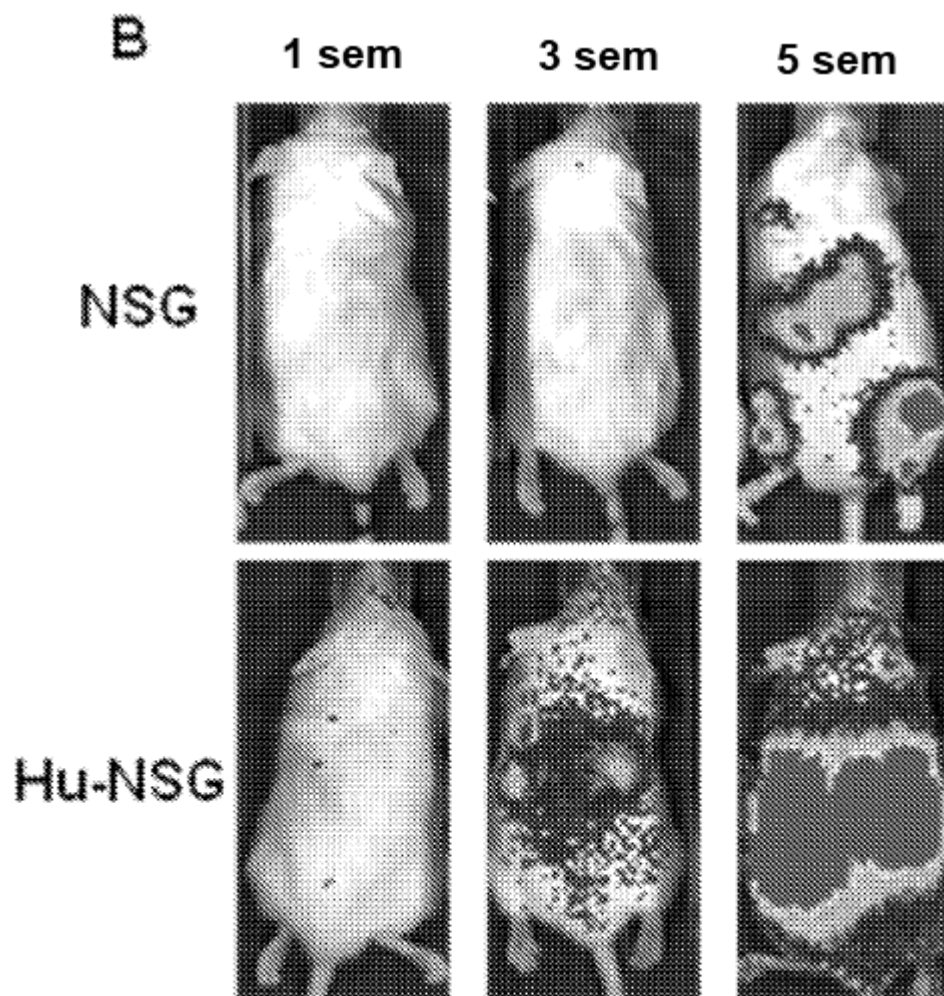


FIG. 10

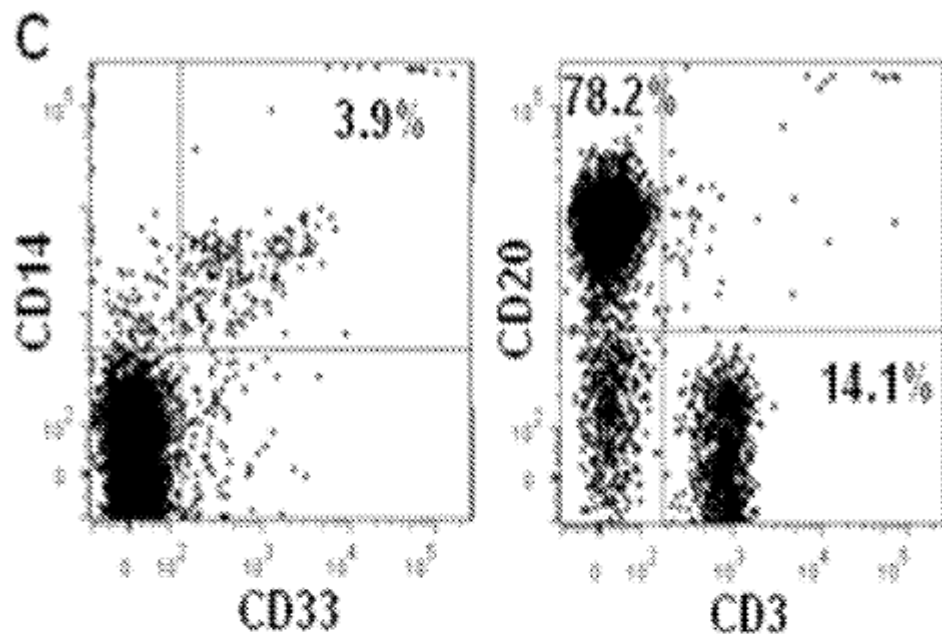


FIG. 10

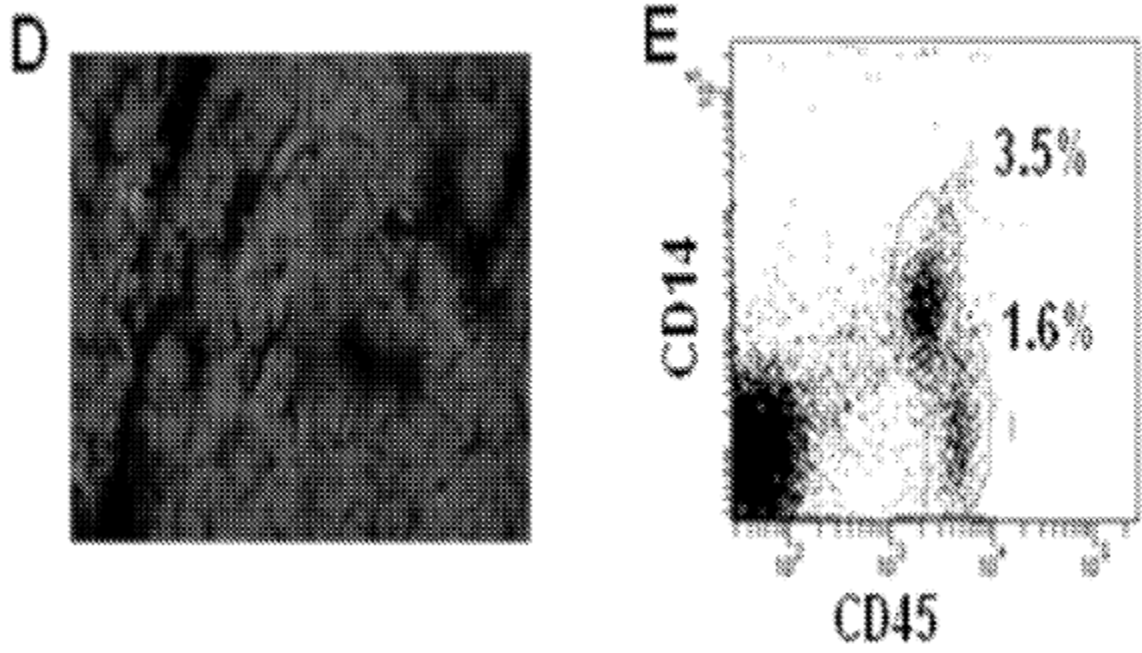


FIG. 10

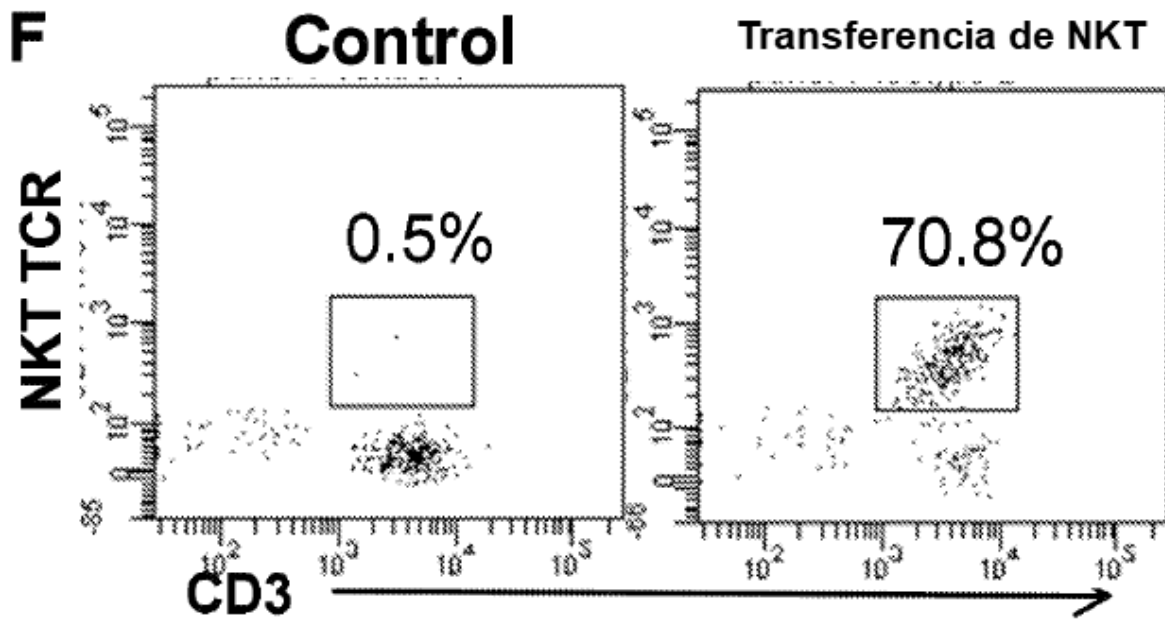


FIG. 10

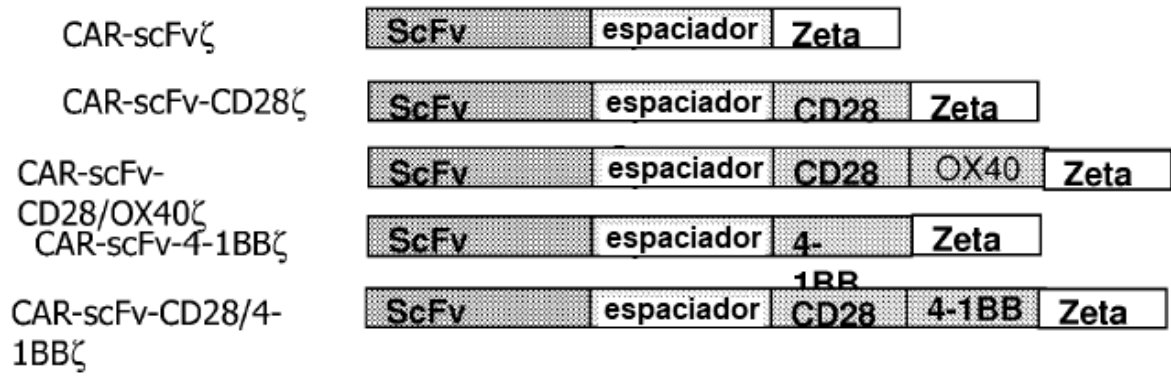
A

FIG. 11

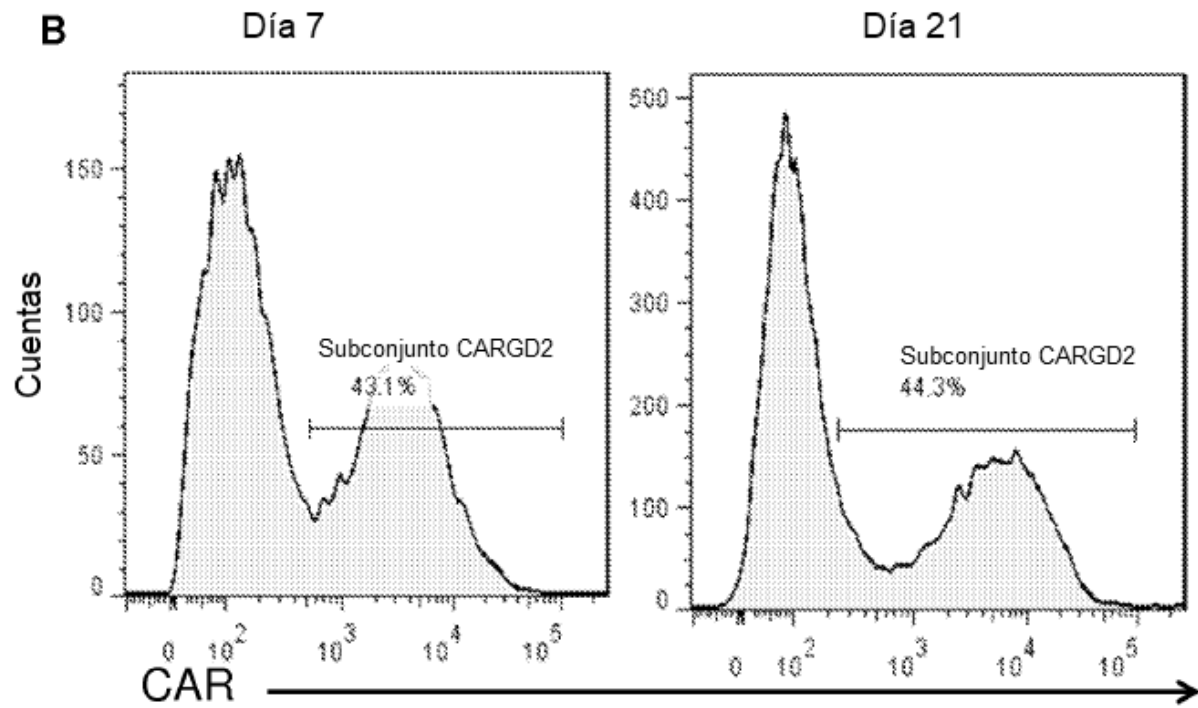


FIG. 11

C

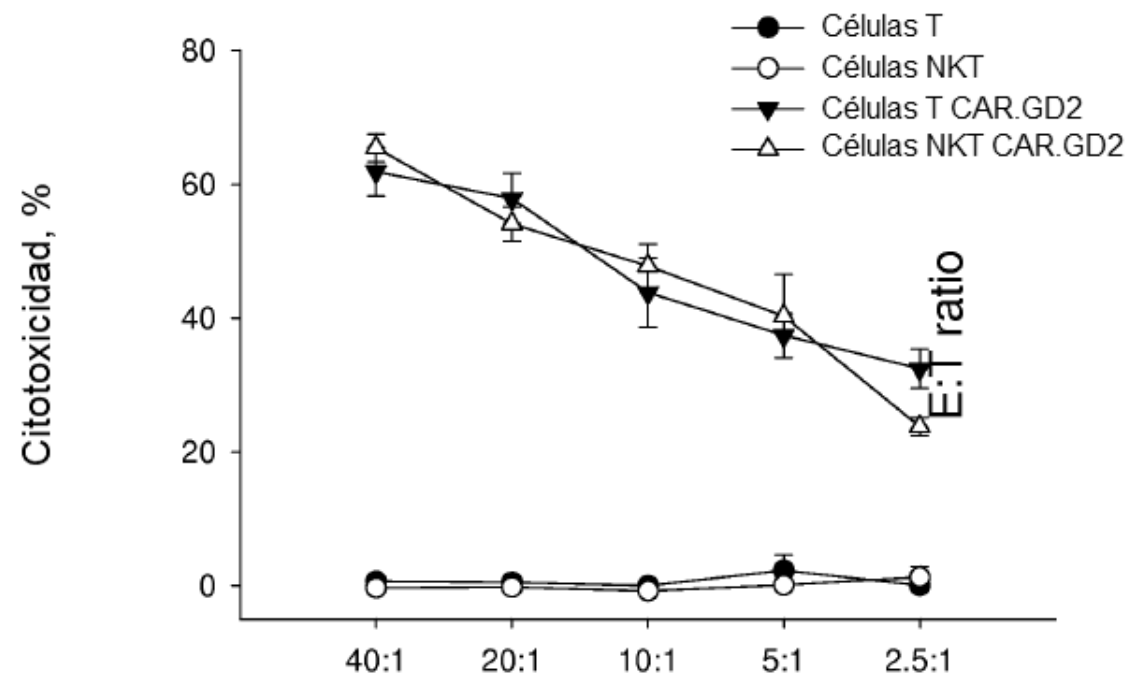


FIG. 11

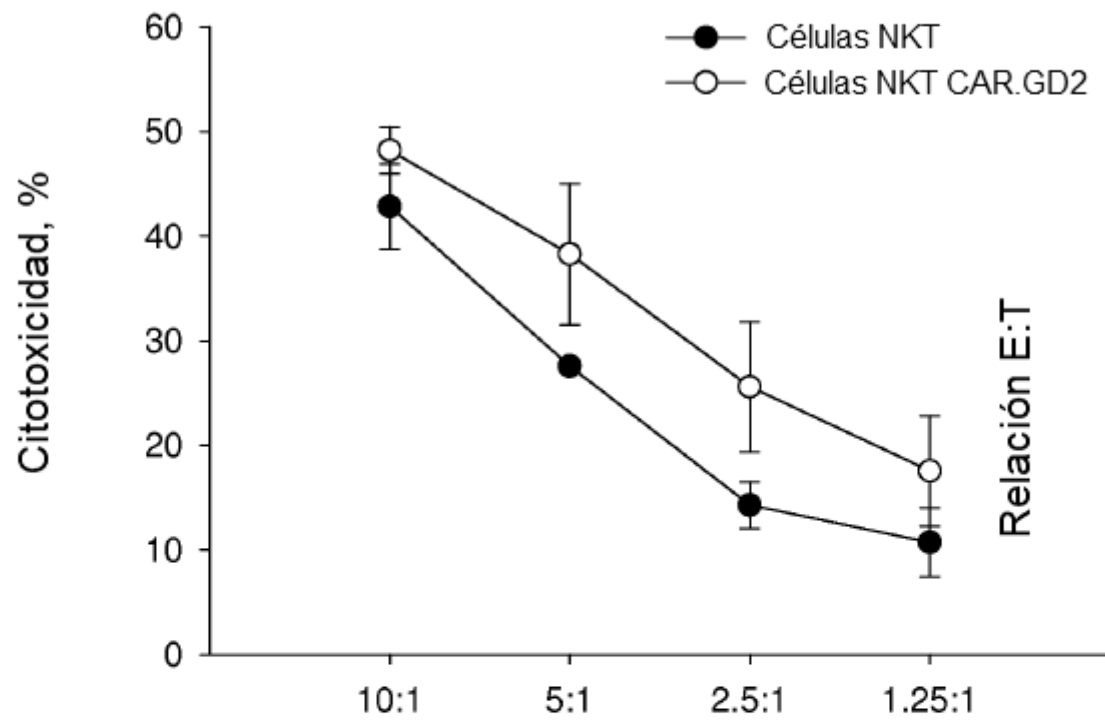
D

FIG. 11

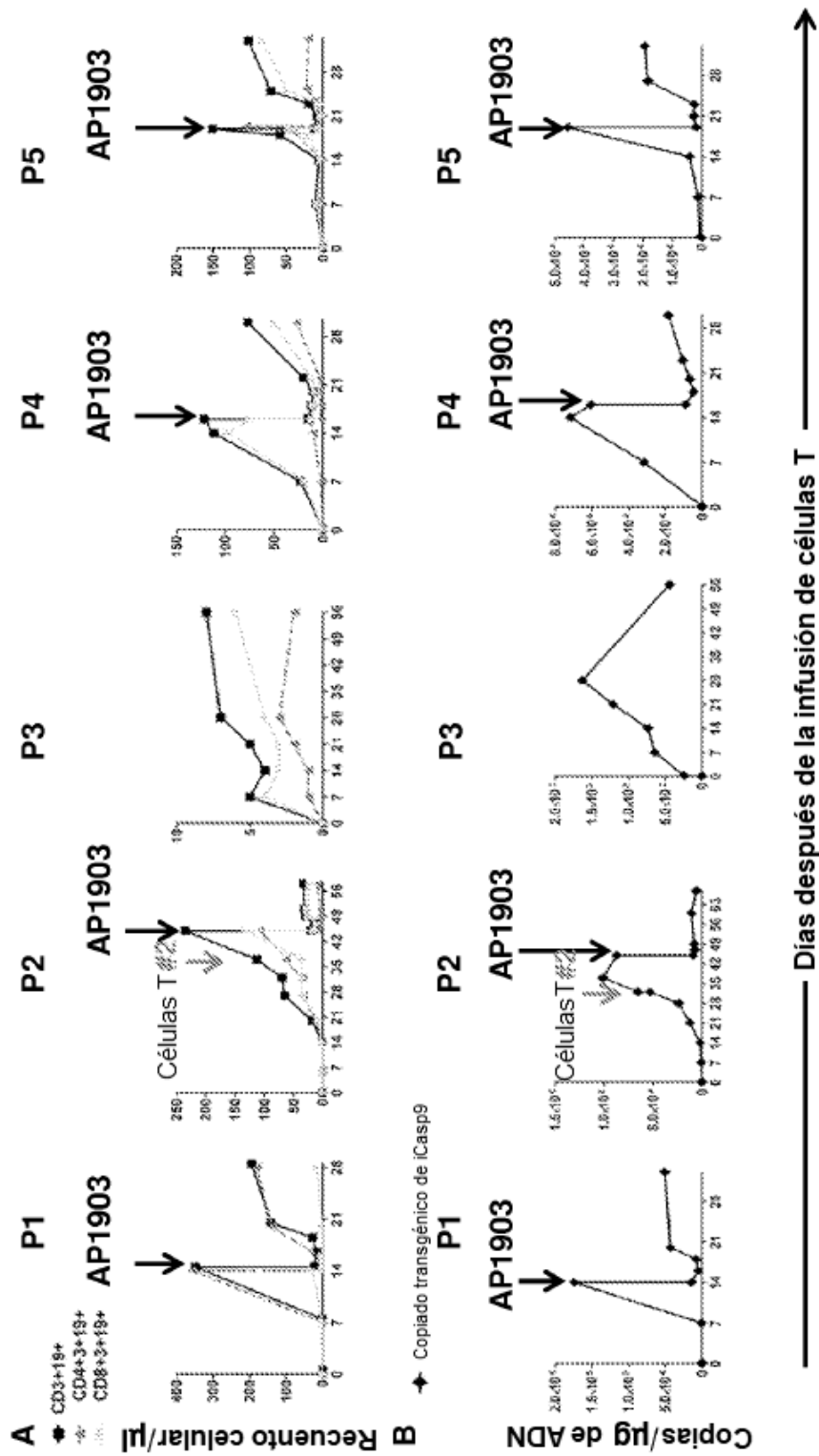


FIG. 12

iC9/CAR.GD2/IL15

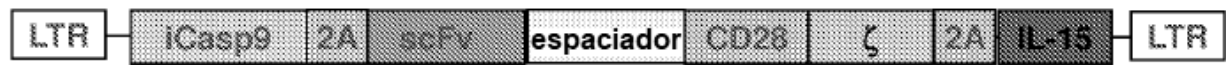
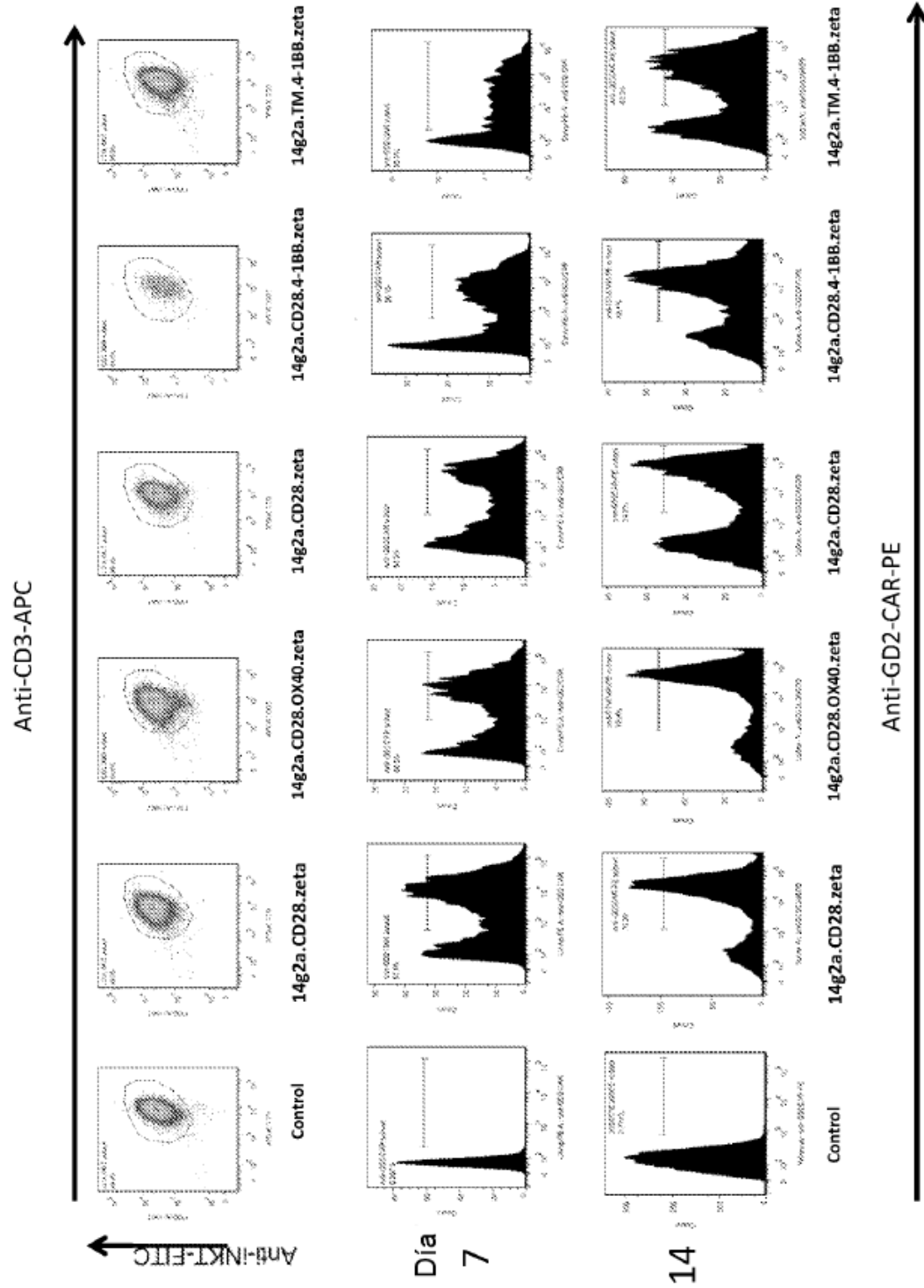
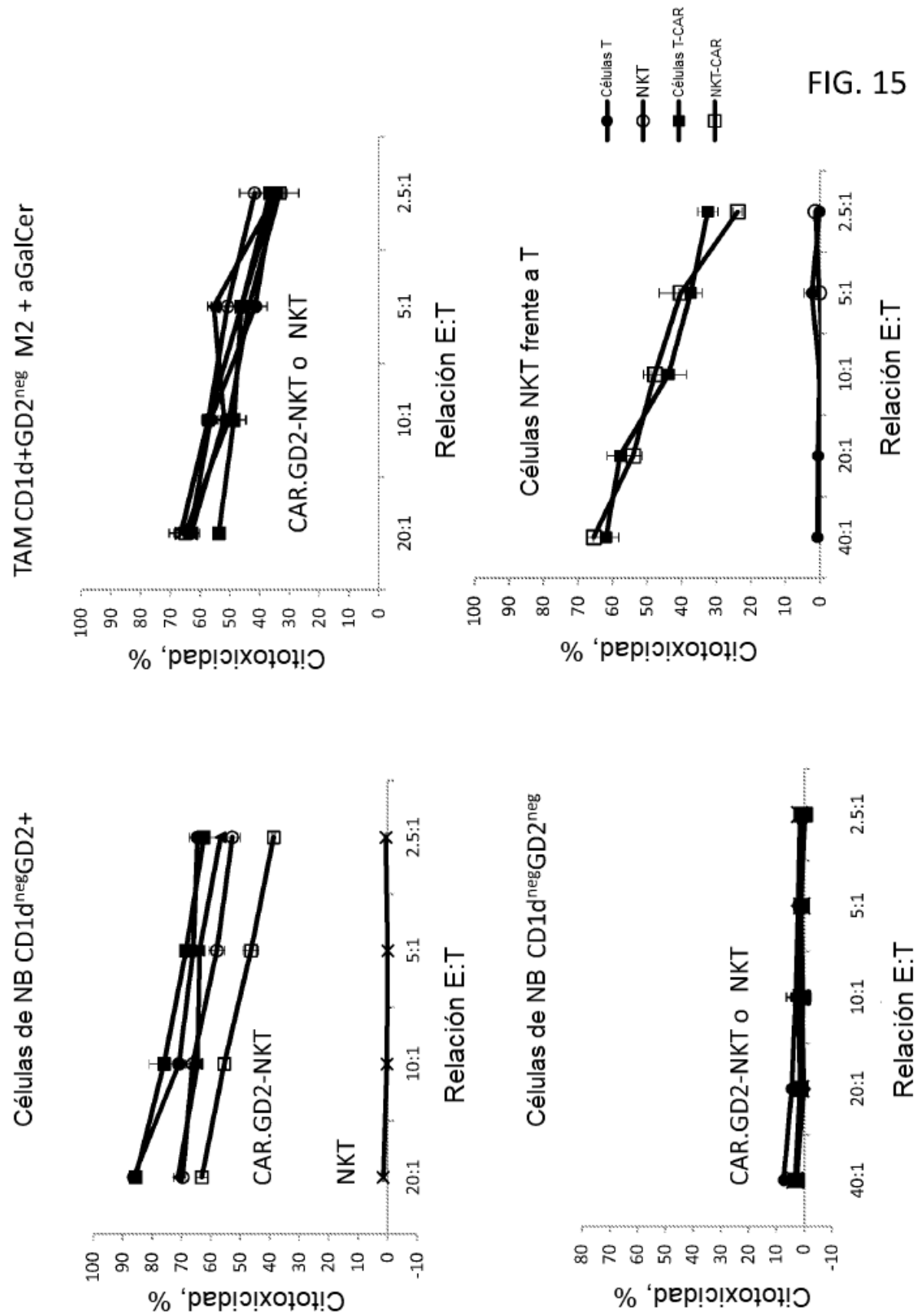
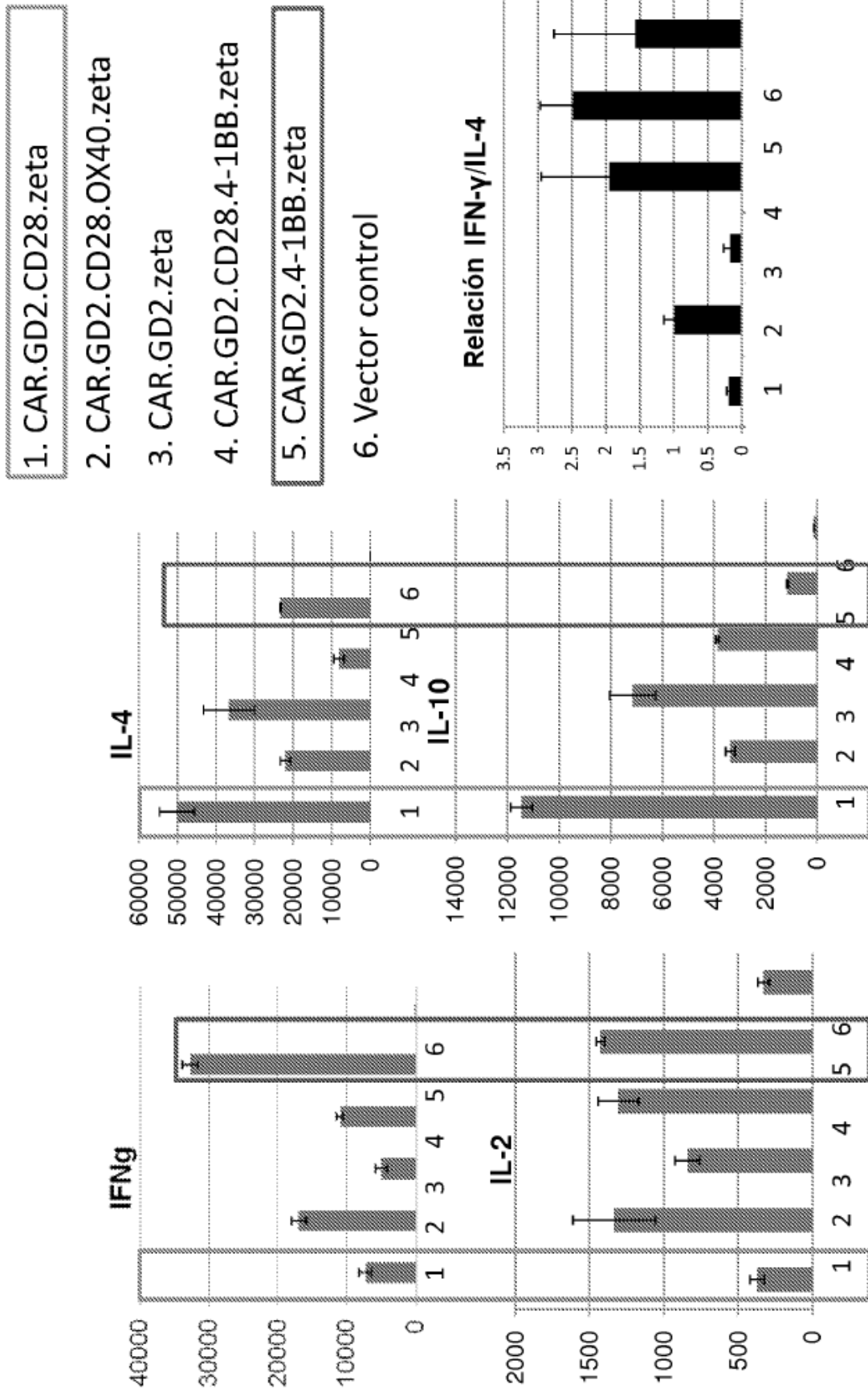


FIG. 13

FIG. 14







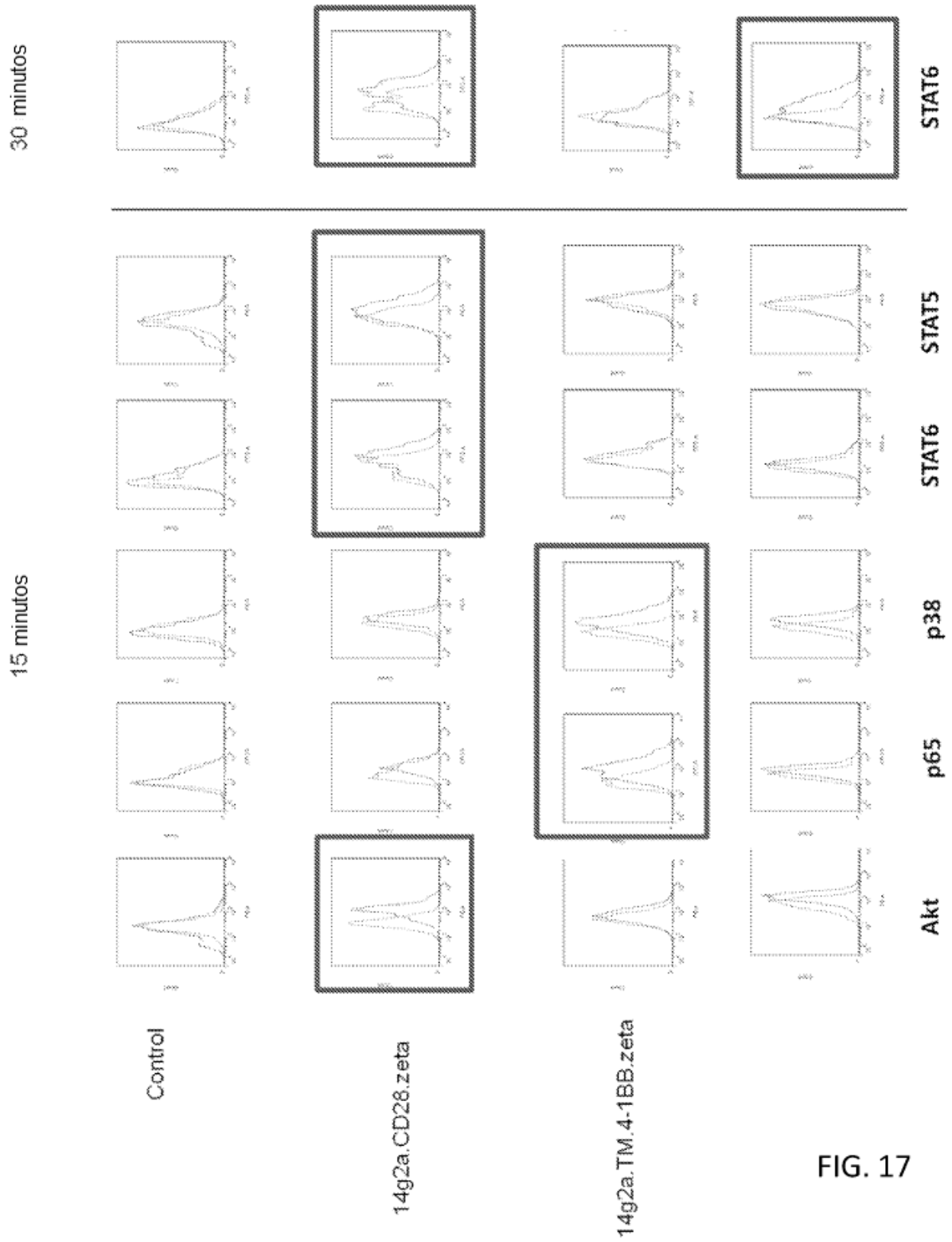


FIG. 17

FIG. 18

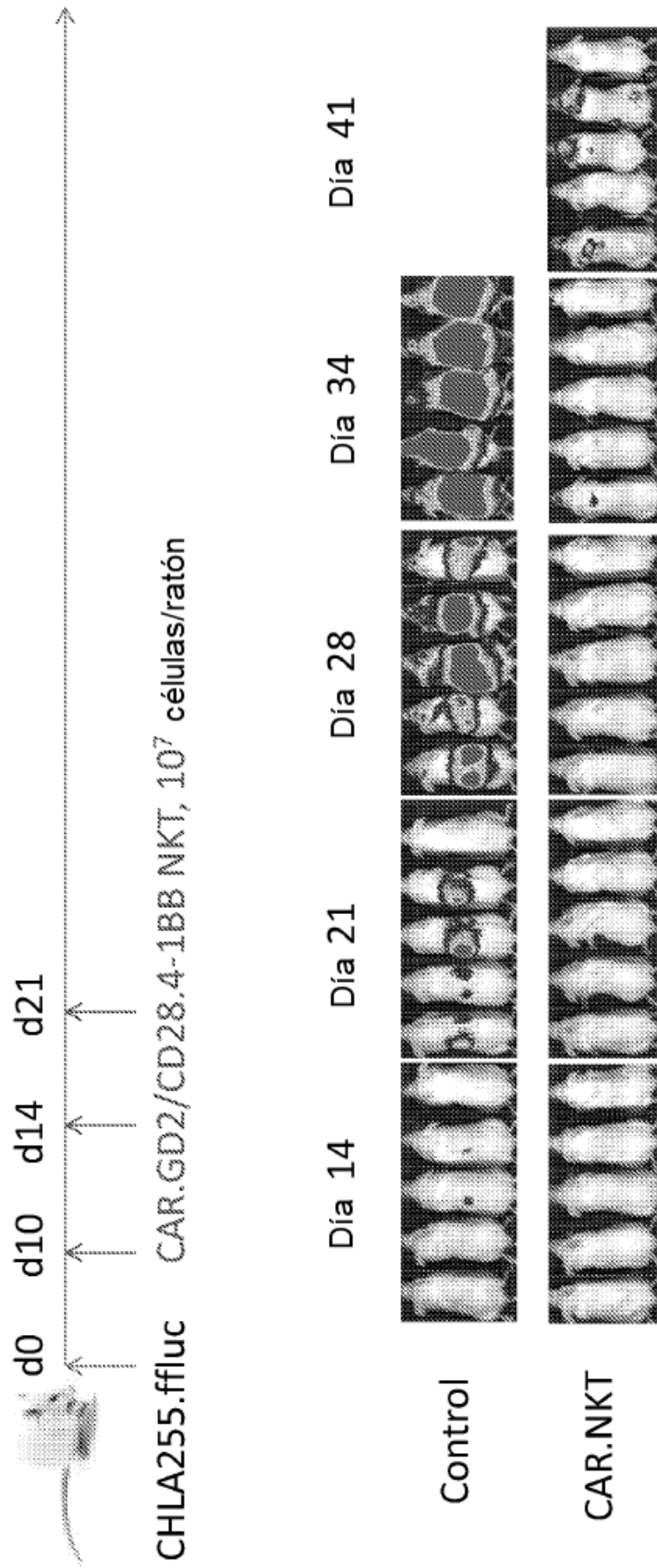


FIG. 19

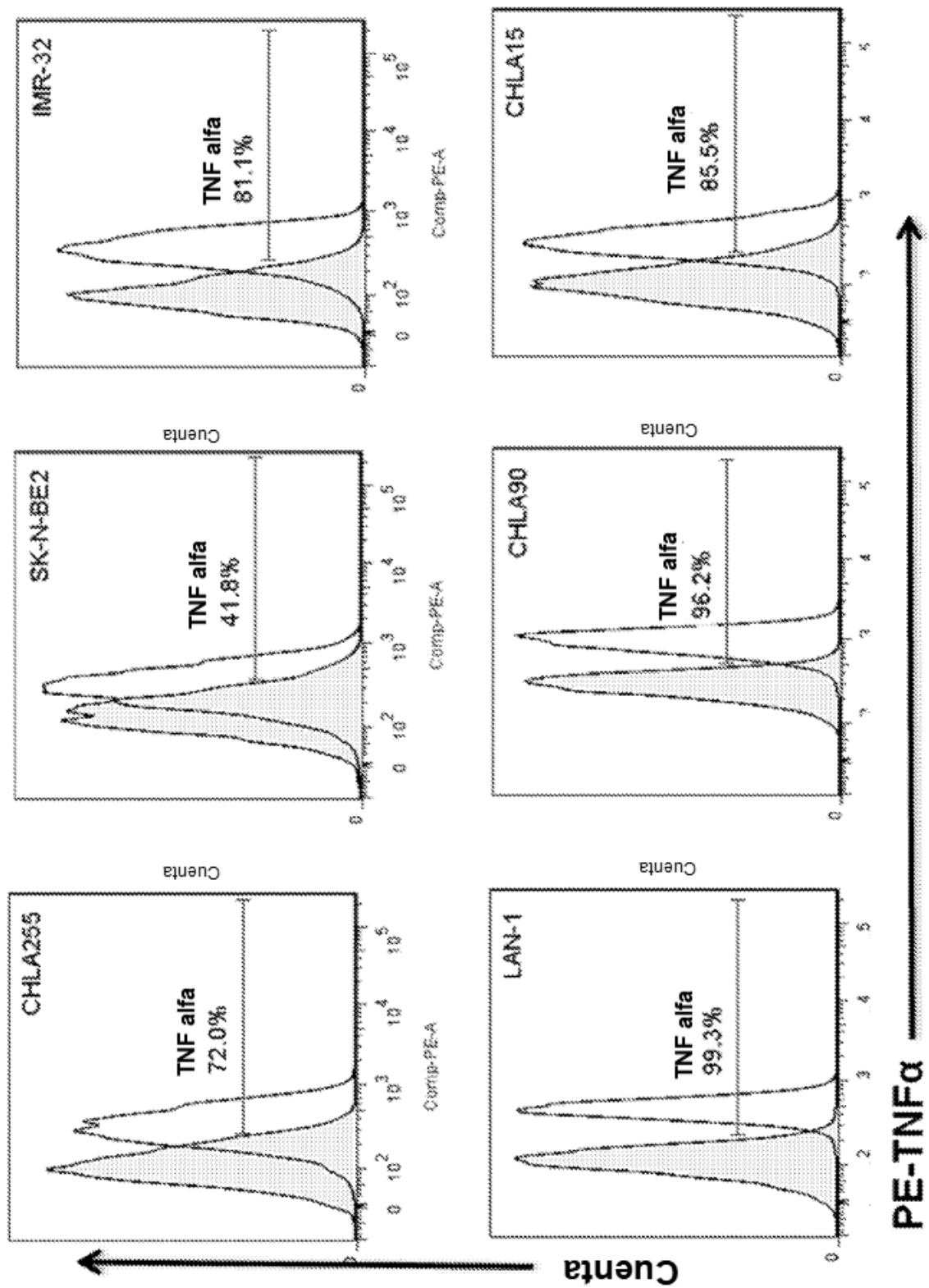
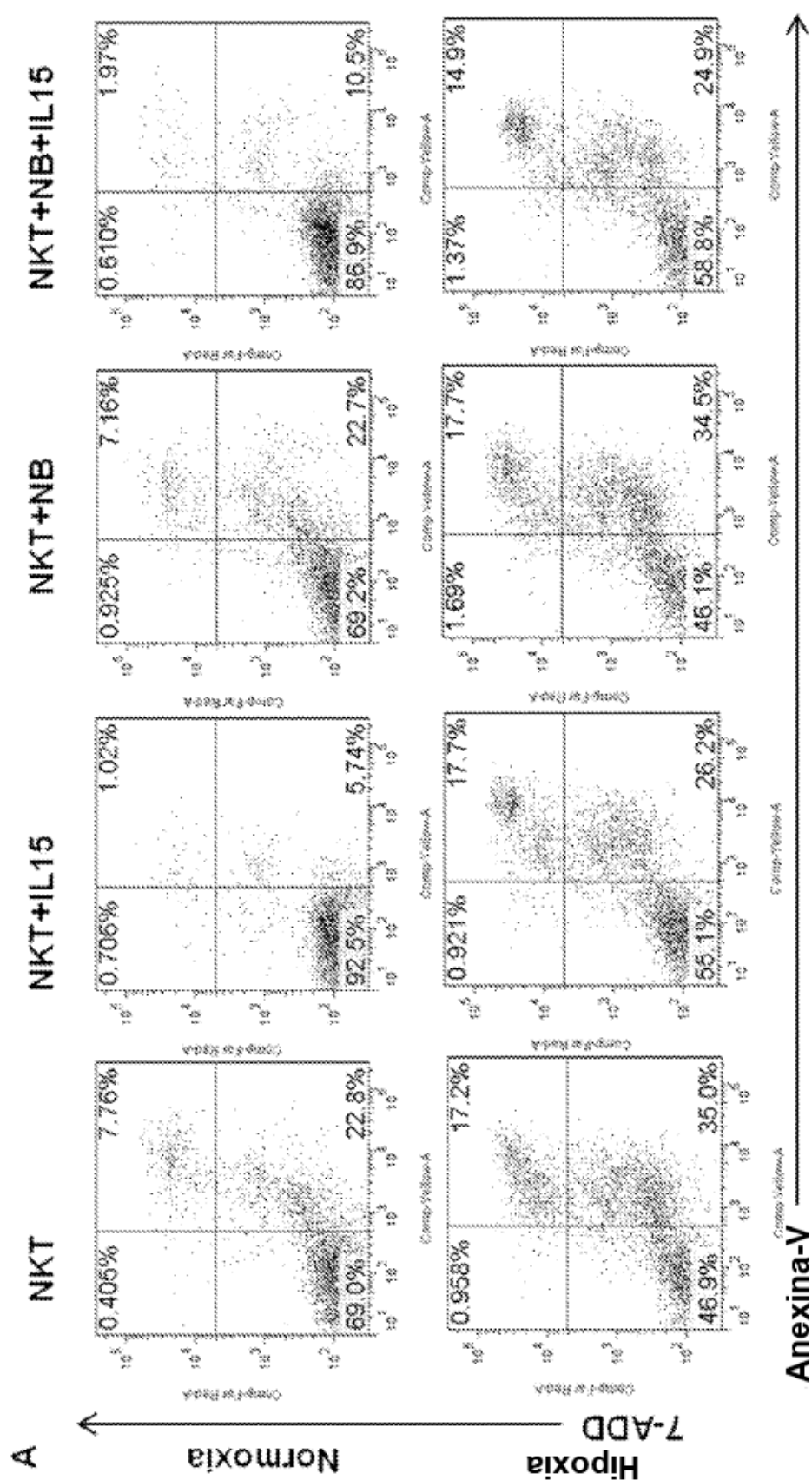


FIG. 20



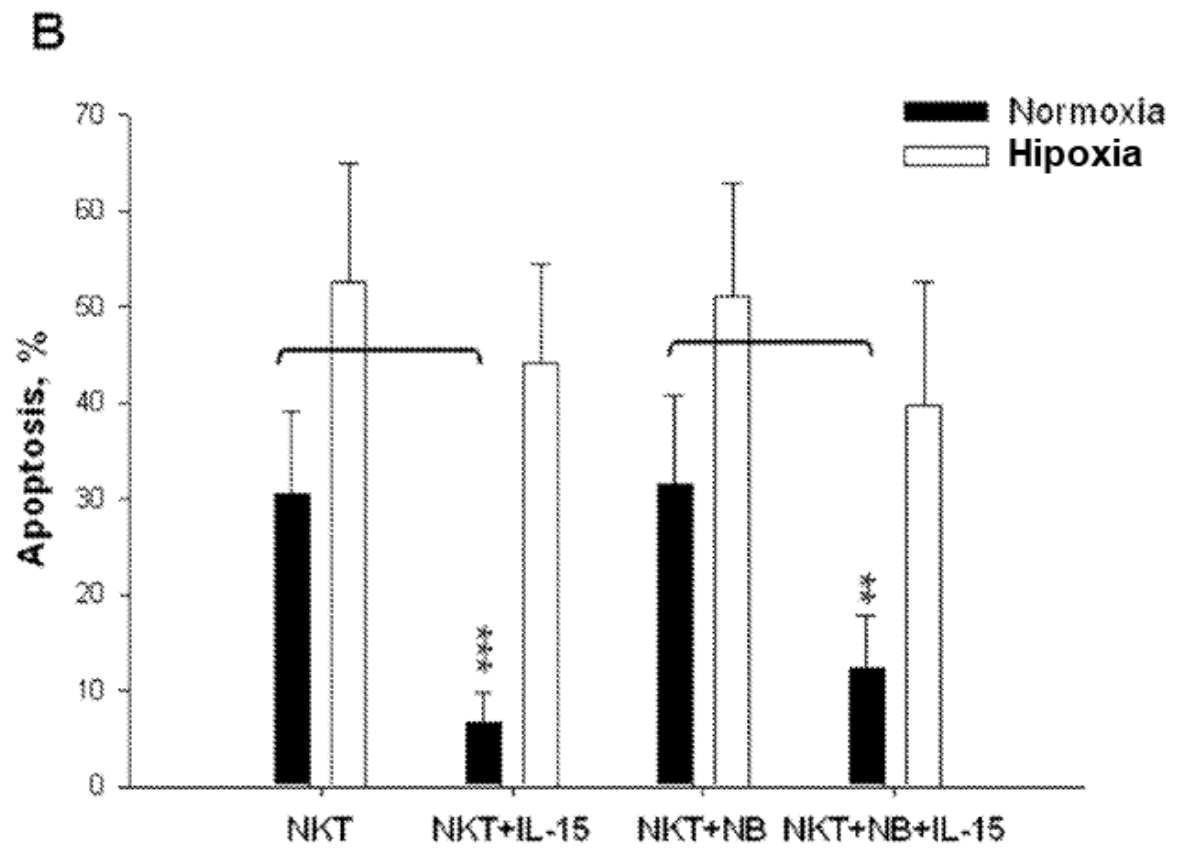


FIG. 20