

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 251**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/17** (2015.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2013 PCT/US2013/038813**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14133568**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2013 E 13725231 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2961416**

54 Título: **Métodos de producción de poblaciones enriquecidas de células T reactivas con tumores a partir de sangre periférica**

30 Prioridad:

**01.03.2013 US 201361771251 P**

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

**06.07.2020**

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)  
Office of Technology Transfer, National Institutes of Health, 6011 Executive Boulevard, Suite 325, MSC 7660  
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**GROS, ALENA y ROSENBERG, STEVEN A.**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 771 251 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

Métodos de producción de poblaciones enriquecidas de células T reactivas con tumores a partir de sangre periférica

5

Esta invención se realizó con apoyo gubernamental bajo el número de proyecto ZIABC010984 de National Institutes of Health, National Cancer Institute. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

### Antecedentes de la invención

10

La terapia celular adoptiva (ACT) usando células T reactivas con tumores puede producir respuestas clínicas positivas en algunos pacientes con cáncer. No obstante, sigue habiendo varios obstáculos para el uso satisfactorio de ACT para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades. Por ejemplo, las células T aisladas de sangre periférica pueden no presentar suficiente reactividad específica de tumor. Por consiguiente, existe la necesidad de métodos mejorados de obtención de una población de células T reactivas con tumores a partir de sangre periférica.

15

Inozume *et al.*, (2010), *J. Immunother.*, 33(9):956-964 describen que la selección de linfocitos CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> en melanomas humanos recientes enriquece células T reactivas con tumores. Gros *et al.*, (2012), *J. Immunother.*, 35(9): 722-723 describen que la selección de PD-1, LAG-3, TIM-3 y 41BB en digestos de tumores recientes enriquece células reactivas con melanoma.

20

### Breve resumen de la invención

25

Una realización de la invención proporciona un método de obtención de una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, comprendiendo el método: (a) obtener una población a granel de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de una muestra de sangre periférica; (b) específicamente seleccionar células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada) y/o TIM-3 (dominio 3 de mucina e inmunoglobulina de células T) a partir de la población a granel; y (c) separar las células seleccionadas en (b) de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, opcionalmente en el que el método comprende además: (i) cultivar la población de células enriquecida obtenida en (c) en presencia de uno cualquiera o más de TWS119 (3-[[6-(3-aminofenil)-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi]fenol), interleucina (IL-21), IL-12, IL-15, IL-7, factor de crecimiento transformante (TGF) beta e inhibidor de AKT (AKTi); (ii) estimular la población de células enriquecida obtenida en (c) con un antígeno tumoral y/o con células T tumorales autólogas; y/o (iii) transducir o transfectar las células de la población enriquecida obtenida en (c) con una secuencia de nucleótidos que codifica para uno cualquiera o más de IL-12, IL-7, IL-15, IL-2, IL-21, mir155 y ARNip anti-PD-1.

30

35

40

La divulgación proporciona un método de administración de una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores a un mamífero, comprendiendo el método: (a) obtener una población a granel de PBMC a partir de una muestra de sangre periférica; (b) seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 y/o TIM-3 a partir de la población a granel; (c) separar las células seleccionadas en (b) de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores; y (d) administrar la población de células enriquecida en células T reactivas con tumores al mamífero.

45

50

Otra realización de la invención proporciona un método de obtención de una composición farmacéutica que comprende una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, comprendiendo el método: (a) obtener una población a granel de PBMC a partir de una muestra de sangre periférica; (b) seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 y/o TIM-3 a partir de la población a granel; (c) separar las células seleccionadas en (b) de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores; y (d) combinar la población de células enriquecida en células T reactivas con tumores con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener una composición farmacéutica que comprende una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, opcionalmente en el que el método comprende además: (i) cultivar la población de células enriquecida obtenida en (c) en presencia de uno cualquiera o más de TWS119 (3-[[6-(3-aminofenil)-7H-pirrolol[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi]fenol), interleucina (IL-21), IL-12, IL-15, IL-7, factor de crecimiento transformante (TGF) beta e inhibidor de AKT (AKTi); (ii) estimular la población de células enriquecida obtenida en (c) con un antígeno tumoral y/o con células T tumorales autólogas; y/o (iii) transducir o transfectar las células de la población enriquecida obtenida en (c) con una secuencia de nucleótidos que codifica para uno cualquiera o más de IL-12, IL-7, IL-15, IL-2, IL-21, mir155 y ARNip anti-PD-1.

55

60

Aspectos adicionales de la divulgación proporcionan poblaciones relacionadas de células y métodos de tratamiento o prevención del cáncer.

### Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

65

Las figuras 1A-1B son gráficos que muestran la secreción de interferón (IFN)-gamma (pg/ml) (barras negras) y el

porcentaje de células CD8<sup>+</sup> que expresan 4-1BB (barras grises) por células que se aislaron a partir de la sangre periférica del paciente con melanoma 1913 (A) o el paciente con melanoma 3713 (B) y que se clasificaron según la expresión de CD8, PD-1 o TIM-3 o la falta de expresión de PD-1 o TIM-3 mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y expandidas *in vitro*, tras cocultivo frente a la línea de células tumorales autóloga.

La figura 1C es un gráfico que muestra la secreción de IFN-gamma (pg/ml) (barras negras) y el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> que expresan 4-1BB (barras grises) por células que se aislaron a partir de la sangre periférica del paciente con melanoma 3289 y que se clasificaron según la expresión de CD8, PD-1, LAG-3 o TIM-3 o la falta de expresión de PD-1 o TIM-3 mediante FACS, tras cocultivo frente al tumor autólogo.

Las figuras 2A-2C son gráficos que muestran el porcentaje de lisis específica de la línea de células tumorales autóloga diana TC1913 (A), la línea de células tumorales alogénica (Alo.) TC3289 (B) o la línea de células tumorales de HLA-A0201 coincidente TC2448 (C) por células efectoras aisladas a partir de la sangre periférica del paciente 1913, clasificadas según la expresión tal como sigue: CD8<sup>+</sup> (círculos blancos), PD-1<sup>+</sup> (círculos negros), PD-1<sup>-</sup> (círculos grises), TIM-3<sup>+</sup> (rombos negros) o TIM-3<sup>-</sup> (rombos grises), y expandidas *in vitro*.

Las figuras 2D-2F son gráficos que muestran el porcentaje de lisis específica de la línea de células tumorales autóloga diana TC3289 (D), la línea de células tumorales alogénica TC1913 (E) o la línea de células tumorales alogénica TC624 (F) por células efectoras aisladas a partir de la sangre periférica del paciente 3289 (D-F) y clasificadas según la expresión tal como sigue: CD8<sup>+</sup> (círculos blancos), PD-1<sup>+</sup> (círculos negros), PD-1<sup>-</sup> (círculos grises), TIM-3<sup>+</sup> (rombos negros) o TIM-3<sup>-</sup> (rombos grises). Se muestra la lisis de células diana tras la expansión *in vitro*.

## 25 Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto que seleccionar células CD8<sup>+</sup> que también expresan los biomarcadores proteína 1 de muerte celular programada (PD-1; CD279) y/o dominio 3 de mucina e inmunoglobulina de células T (TIM-3) enriquece células T reactivas con tumores presentes en sangre periférica. Seleccionar las células CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 y/o TIM-3 enriquece ventajosamente mayores números de células T reactivas con tumores en comparación con células CD8<sup>+</sup> que no expresan estos marcadores.

En este sentido, una realización de la invención proporciona un método de obtención de una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, comprendiendo el método: (a) obtener una población a granel de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de una muestra de sangre periférica; (b) seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 y/o TIM-3 a partir de la población a granel; y (c) separar las células seleccionadas en (b) de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, opcionalmente en el que el método comprende además: (i) cultivar la población de células enriquecida obtenida en (c) en presencia de uno cualquiera o más de TWS119 (3-[[6-(3-aminofenil)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi]fenol), interleucina (IL-21), IL-12, IL-15, IL-7, factor de crecimiento transformante (TGF) beta e inhibidor de AKT (AKTi); (ii) estimular la población de células enriquecida obtenida en (c) con un antígeno tumoral y/o con células T tumorales autólogas; y/o (iii) transducir o transfectar las células de la población enriquecida obtenida en (c) con una secuencia de nucleótidos que codifica para uno cualquiera o más de IL-12, IL-7, IL-15, IL-2, IL-21, mir155 y ARNip anti-PD-1. Los métodos de la invención hacen posible ventajosamente acortar el tiempo de cultivo *in vitro* y seleccionar células T reactivas con tumores sin tener que examinar el reconocimiento de tumores autólogos.

El método comprende obtener una población a granel de PBMC a partir de una muestra de sangre periférica mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Se da a conocer en el presente documento que los métodos adecuados de obtención de una población a granel de PBMC pueden incluir, pero no se limitan a, una extracción de sangre y/o una leucoféresis. La población a granel de PBMC obtenida a partir de una muestra tumoral puede comprender células T, incluyendo células T reactivas con tumores.

La sangre periférica puede obtenerse de cualquier mamífero. A menos que se establezca otra cosa, tal como se usa en el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos del orden Logomorpha, tales como conejos; el orden Carnivora, incluyendo felinos (gatos) y caninos (perros); el orden Artiodactyla, incluyendo bovinos (vacas) y porcinos (cerdos); o del orden Perissodactyla, incluyendo equinos (caballos). Se prefiere que los mamíferos sean primates no humanos, por ejemplo, del orden Primates, cébidos o simioides (monos) o del orden Anthrooidea (seres humanos y simios). En algunas realizaciones, el mamífero puede ser del orden Rodentia, tales como ratones y hámsters. Preferiblemente, el mamífero es un primate no humano o un ser humano. Un mamífero especialmente preferido es el ser humano.

El método comprende seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 y/o TIM-3 a partir de la población a granel. En una realización preferida, el método comprende seleccionar células que también expresan CD3. El método puede comprender específicamente seleccionar las células de cualquier manera

adecuada. Preferiblemente, la selección se lleva a cabo usando citometría de flujo. La citometría de flujo puede llevarse a cabo usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. La citometría de flujo puede emplear cualquier tinción o anticuerpo adecuado. Por ejemplo, la selección específica de CD3, CD8, TIM-3 o PD-1 puede llevarse a cabo usando anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-TIM-3 o anti-PD-1, respectivamente.

5 Preferiblemente, el anticuerpo se elige de manera que reconoce específicamente y se une al biomarcador particular que está seleccionándose. El anticuerpo o anticuerpos pueden conjugarse con una perla (por ejemplo, una perla magnética) o con un fluorocromo. Preferiblemente, la citometría de flujo es clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

10 Seleccionar específicamente comprende seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que son positivas para la expresión de uno cualquiera de TIM-3, PD-1, o tanto TIM-3 como PD-1. En este sentido, seleccionar específicamente comprende seleccionar específicamente células T que son solo positivas para la expresión de TIM-3 o PD-1 o doblemente positivas para la coexpresión simultánea de TIM-3 y PD-1. En una realización de la invención, el método comprende seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que expresan TIM-3 a partir de la población a granel. En todavía otra realización de la invención, el método comprende seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que expresan PD-1 a partir de la población a granel. Todavía otra realización de la invención comprende seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que son (i) TIM-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>, (ii) TIM-3<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup> o (iii) TIM-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup> a partir de la población a granel. En otra realización de la invención, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede comprender además seleccionar células que también expresan CD3<sup>+</sup>.

20 El método comprende separar las células seleccionadas de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores. En este sentido, las células seleccionadas pueden separarse físicamente de las células no seleccionadas. Las células seleccionadas pueden separarse de las células no seleccionadas mediante cualquier método adecuado tal como, por ejemplo, clasificación. Separar las células seleccionadas de las células no seleccionadas produce una población de células que está enriquecida en células T reactivas con tumores.

25 Las poblaciones de células obtenidas mediante los métodos de la invención están ventajosamente enriquecidas en células T reactivas con tumores. En este sentido, las poblaciones de células obtenidas mediante los métodos de la invención pueden comprender una mayor proporción de células T reactivas con tumores en comparación con poblaciones de células que no se han obtenido clasificando según la expresión de TIM-3 y/o PD-1.

30 En una realización de la invención, el método comprende obtener la población de células enriquecida en células T reactivas con tumores sin examinar el reconocimiento de tumores autólogos. En este sentido, se describe en el presente documento una población de células que está enriquecida en células que tienen reactividad tumoral sin tener que examinar las células para el reconocimiento de tumores autólogos.

35 En una realización de la invención, el método no comprende estimular inespecíficamente la población a granel de células T antes de seleccionar específicamente las células. En este sentido, se describe en el presente documento una población de células que está enriquecida en células T reactivas con tumores sin estimular la población a granel de células T inespecíficamente (por ejemplo, con anticuerpos anti-4-1BB, anticuerpos anti-CD3 y/o anticuerpos anti-CD28).

40 En una realización de la invención, el método comprende además expandir los números de células T en la población de células enriquecida obtenida mediante los métodos de la invención *in vitro*. Los números de células T pueden aumentarse al menos aproximadamente 3 veces (o 4, 5, 6, 7, 8 o 9 veces), más preferiblemente al menos aproximadamente 10 veces (o 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 veces), más preferiblemente al menos aproximadamente 100 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.000 veces, o lo más preferiblemente al menos aproximadamente 100.000 veces. Los números de células T pueden expandirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Se describen métodos a modo de ejemplo para expandir los números de células en la patente estadounidense 8.034.334 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0244133.

45 En una realización de la invención, el método comprende además cultivar la población de células enriquecida obtenida mediante los métodos de la invención en presencia de uno cualquiera o más de TWS119, interleucina (IL-21), IL-12, IL-15, IL-7, factor de crecimiento transformante (TGF) beta e inhibidor de AKT (AKTi). Sin querer restringirse a una teoría particular, se cree que cultivar la población de células enriquecida en presencia de TWS119, IL-21 y/o IL-12 puede potenciar, ventajosamente, la reactividad antitumoral de la población de células enriquecida impidiendo o retardando la diferenciación de la población de células enriquecida.

60 En una realización de la invención, el método comprende además transducir o transfectar las células de la población enriquecida obtenida mediante cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento con una secuencia de nucleótidos que codifica para uno cualquiera o más de IL-12, IL-7, IL-15, IL-2, IL-21, mir155 y ARNip anti-PD-1.

65 En una realización de la invención, el método comprende además estimular la población de células enriquecida

obtenida mediante los métodos de la invención con un antígeno de cáncer y/o con células tumorales autólogas. La estimulación de la población de células enriquecida con un antígeno de cáncer y/o con células tumorales autólogas puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, estimular la población de células enriquecida puede llevarse a cabo poniendo en contacto físicamente la población de células enriquecida con un antígeno de cáncer y/o con células tumorales autólogas. Sin querer restringirse a una teoría particular, se cree que estimular la población de células enriquecida con un antígeno de cáncer y/o con células tumorales autólogas puede potenciar, ventajosamente, la reactividad antitumoral de la población de células enriquecida.

El término “antígeno de cáncer” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula (por ejemplo, proteína, péptido, lípido, hidrato de carbono, etc.) expresada o sobreexpresada única o predominantemente por una célula tumoral o célula cancerosa, de manera que el antígeno está asociado con el tumor o cáncer. El antígeno de cáncer puede expresarse adicionalmente por células normales, no tumorales o no cancerosas. Sin embargo, en tales casos, la expresión del antígeno de cáncer por células normales, no tumorales o no cancerosas no es tan robusta como la expresión por células tumorales o cancerosas. En este sentido, las células tumorales o cancerosas pueden sobreexpresar el antígeno o expresar el antígeno a un nivel significativamente superior, en comparación con la expresión del antígeno por células normales, no tumorales o no cancerosas. Además, el antígeno de cáncer puede expresarse adicionalmente por células de un estado de desarrollo o maduración diferente. Por ejemplo, el antígeno de cáncer puede expresarse adicionalmente por células de la fase embrionaria o fetal, células que no se encuentran normalmente en un huésped adulto. Alternativamente, el antígeno de cáncer puede expresarse adicionalmente por células madre o células precursoras, células que no se encuentran normalmente en un huésped adulto.

El antígeno de cáncer puede ser un antígeno expresado por cualquier célula de cualquier cáncer o tumor, incluyendo los cánceres y tumores descritos en el presente documento. El antígeno de cáncer puede ser un antígeno de cáncer de solo un tipo de cáncer o tumor, de manera que el antígeno de cáncer está asociado con o es característico de solo un tipo de cáncer o tumor. Alternativamente, el antígeno de cáncer puede ser un antígeno de cáncer (por ejemplo, puede ser característico) de más de un tipo de cáncer o tumor. Por ejemplo, el antígeno de cáncer puede expresarse por tanto células de cáncer de mama como de próstata y no expresarse en absoluto por células normales, no tumorales o no cancerosas. Los antígenos de cáncer a modo de ejemplo puede incluir uno cualquiera o más de gp100, MART-1, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, NY-ESO-1, receptor 2 de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2), HER-2, mesotelina y variante III de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR III).

Los métodos de la invención producen ventajosamente poblaciones de células enriquecidas en células T reactivas con tumores. Las células T pueden ser reactivas con tumores de manera que reconocen, lisan y/o destruyen específicamente células tumorales. En este sentido, la divulgación proporciona una población de células aislada o purificada enriquecida en células T reactivas con tumores obtenida mediante cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento. En un aspecto de la divulgación, la población de células aislada o purificada comprende (a) células T CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>, (b) células T CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup> y (c) células T CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>-</sup>/PD-1<sup>-</sup>, en la que la población de células está enriquecida en células T reactivas con tumores. En otro aspecto de la divulgación, la población de células aislada o purificada comprende (a) células T CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>, (b) células T CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup> o (c) células T CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup>. En otro aspecto de la divulgación, cualquiera de las poblaciones de células descritas en el presente documento puede ser también CD3<sup>+</sup>.

En un aspecto de la divulgación, la población de células aislada o purificada comprende una mezcla de células que expresan cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento. Por ejemplo, la población de células aislada o purificada puede comprender una combinación de células PD-1<sup>+</sup> y células TIM-3<sup>+</sup>. En otro aspecto de la divulgación, cualquiera de las poblaciones de células descritas en el presente documento puede ser también CD8<sup>+</sup> y/o CD3<sup>+</sup>.

El término “aislado” tal como se usa en el presente documento significa que se ha retirado de su entorno natural. El término “purificado” tal como se usa en el presente documento significa que su pureza se ha aumentado, en el que “pureza” es un término relativo, y no ha de interpretarse necesariamente como pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser de al menos aproximadamente el 50%, puede ser mayor del 60%, 70% u 80%, 90% o puede ser del 100%.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método de administración de una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores a un mamífero, comprendiendo el método: (a) obtener una población a granel de PBMC a partir de una muestra de sangre periférica; (b) seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 y/o TIM-3 a partir de la población a granel; (c) separar las células seleccionadas en (b) de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores; y (d) administrar la población de células enriquecida en células T reactivas con tumores al mamífero. La obtención de una población a granel de PBMC a partir de una muestra de sangre periférica, específicamente la sección de células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 y/o TIM-3 a partir de la población a granel, y la

separación de las células seleccionadas de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores pueden llevarse a cabo tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención.

- 5 El método dado a conocer puede comprender además administrar la población de células enriquecida en células T reactivas con tumores al mamífero. La población de células enriquecida en células T reactivas con tumores puede administrarse de cualquier manera adecuada. Preferiblemente, la población de células enriquecida en células T reactivas con tumores se administra mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa.
- 10 La población de células dada a conocer enriquecida en células T reactivas con tumores puede incluirse en una composición, tal como una composición farmacéutica. En este sentido, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las poblaciones de células descritas en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 Otra realización de la invención proporciona un método de obtención de una composición farmacéutica que comprende una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, comprendiendo el método: (a) obtener una población a granel de PBMC a partir de una muestra de sangre periférica; (b) seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 y/o TIM-3 a partir de la población a granel; (c) separar las células seleccionadas en (b) de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores; y (d) combinar la población de células enriquecida en células T reactivas con tumores con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener una composición farmacéutica que comprende una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, opcionalmente en el que el método comprende además: (i) cultivar la población de células enriquecida obtenida en (c) en presencia de uno cualquiera o más de TWS119 (3-[[6-(3-aminofenil)-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi]fenol), interleucina (IL-21), IL-12, IL-15, IL-7, factor de crecimiento transformante (TGF) beta e inhibidor de AKT (AKTi); (ii) estimular la población de células enriquecida obtenida en (c) con un antígeno tumoral y/o con células T tumorales autólogas; y/o (iii) transducir o transfectar las células de la población enriquecida obtenida en (c) con una secuencia de nucleótidos que codifica para uno cualquiera o más de IL-12, IL-7, IL-15, IL-2, IL-21, mir155 y ARNip anti-PD-1.
- 20 La obtención de una población a granel de PBMC a partir de una muestra de sangre periférica, específicamente la selección de células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 y/o TIM-3 a partir de la población a granel y la separación de las células seleccionadas de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores pueden llevarse a cabo tal como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención.
- 25 El método comprende combinar la población de células enriquecida en células T reactivas con tumores con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener una composición farmacéutica que comprende una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores. El portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de los usados convencionalmente para la administración de células. Tales portadores farmacéuticamente aceptables los conocen bien los expertos en la técnica y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que no tiene efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso. Un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para las células para inyección puede incluir cualquier portador isotónico tal como, por ejemplo, solución salina normal (aproximadamente el 0,90% p/v de NaCl en agua, aproximadamente 300 mOsm/l de NaCl en agua o aproximadamente 9,0 g de NaCl por litro de agua), disolución de electrolito NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL), aproximadamente el 5% de dextrosa en agua o lactato de Ringer. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable se suplementa con albúmina sérica humana.
- 30
- 35
- 40
- 45

50 Para los fines de la divulgación, la dosis, por ejemplo, número de células en la población de células dada a conocer enriquecida en células T reactivas con tumores, administrada debe ser suficiente para efectuar, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica en el mamífero a lo largo de un lapso de tiempo razonable. Por ejemplo, el número de células debe ser suficiente para unirse a un antígeno de cáncer, o detectar, tratar o prevenir el cáncer en un periodo de desde aproximadamente 2 horas o más, por ejemplo, de 12 a 24 o más horas, desde el momento de la administración. El periodo de tiempo podría ser incluso más largo. El número de células se determinará mediante, por ejemplo, la eficacia de las células particulares y el estado del mamífero (por ejemplo, ser humano), así como el peso corporal del mamífero (por ejemplo, ser humano) que va a tratarse.

55

60 En la técnica se conocen muchos ensayos para determinar el número de células administradas a partir de la población de células dada a conocer enriquecida en células T reactivas con tumores. Para los fines de la divulgación, un ensayo que comprende comparar el grado en el que se lisan células diana o se secretan una o más citocinas tales como, por ejemplo, IFN- $\gamma$  e IL-2 tras la administración de un número dado de tales células a un mamífero, entre un conjunto de mamíferos a cada uno de los cuales se le administra un número diferente de las células, podría usarse para determinar el número de partida que va a administrarse a un mamífero. El grado en el que se lisan células diana, o se secretan citocinas tales como, por ejemplo, IFN- $\gamma$  e IL-2, tras la administración de un determinado número de células, puede someterse a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica. La secreción de citocinas tales como, por ejemplo, IL-2, también puede proporcionar una indicación

65

de la calidad (por ejemplo, fenotipo y/o eficacia) de una preparación de células.

El número de las células a partir de la población de células dada a conocer enriquecida en células T reactivas con tumores también se determinará por la existencia, la naturaleza y el grado de cualquier efecto secundario adverso que pudiera acompañar a la administración de una población de células particular. Normalmente, el médico encargado decidirá el número de las células con las que tratar a cada paciente individual, teniendo en consideración una variedad de factores, tales como la edad, el peso corporal, la salud general, la dieta, el sexo, la vía de administración y la gravedad del estado que está tratándose. A modo de ejemplo, el número de células puede ser de aproximadamente  $10 \times 10^6$  a aproximadamente  $10 \times 10^{11}$  células por infusión, de aproximadamente  $10 \times 10^9$  células a aproximadamente  $10 \times 10^{11}$  células por infusión o de  $10 \times 10^7$  a aproximadamente  $10 \times 10^9$  células por infusión. Las poblaciones de células descritas en el presente documento, ventajosamente, pueden hacer posible tratar o prevenir eficazmente el cáncer.

Se contempla que las poblaciones de células descritas en el presente documento puedan usarse en métodos de tratamiento o prevención del cáncer. En este sentido, la divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero, que comprende administrar al mamífero las composiciones farmacéuticas o poblaciones de células descritas en el presente documento en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero. Otro aspecto de la divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores a un mamífero mediante cualquiera de los métodos dados a conocer descritos en el presente documento en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

Los términos “tratar” y “prevenir” así como palabras procedentes de los mismos, tal como se usan en el presente documento, no implican necesariamente el tratamiento o prevención del 100% o completo. Más bien, hay grados variables de tratamiento o prevención de los cuales un experto habitual en la técnica reconoce que tienen un beneficio potencial o beneficio terapéutico. En este sentido, los métodos dados a conocer pueden proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el método dado a conocer puede incluir el tratamiento o la prevención de uno o más estados o síntomas de la enfermedad, por ejemplo, cáncer, que está tratándose o previniéndose. Además, para los fines en el presente documento, “prevención” puede abarcar retrasar la aparición de la enfermedad, o un síntoma o estado de la misma.

Para los fines de los métodos dados a conocer, en los que se administran las poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogénicas o autólogas para el mamífero. Preferiblemente, las células son autólogas para el mamífero.

Un aspecto de la divulgación comprende además la linfodepleción del mamífero antes de administrar cualquiera de las poblaciones de células enriquecidas descritas en el presente documento. Los ejemplos de linfodepleción incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia de linfodepleción no mieloablativa, quimioterapia de linfodepleción mieloablativa, irradiación corporal total, etc.

Con respecto a los métodos dados a conocer, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de sarcomas (por ejemplo, sarcoma sinovial, sarcoma osteogénico, leiomioma uterino y rhabdomyosarcoma alveolar), linfomas (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin), carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, cáncer óseo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal o recto anal, cáncer de ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer del cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de la nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon (por ejemplo, carcinoma de colon), cáncer esofágico, cáncer cervical, cáncer gastrointestinal (por ejemplo, tumor carcinoide gastrointestinal), cáncer de hipofaringe, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, peritoneo, epiplón y cáncer de mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de uréter y cáncer de vejiga urinaria.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

### Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra el reconocimiento de tumores autólogos *in vitro* de células T aisladas de la sangre periférica de pacientes con melanoma según la expresión de PD-1, TIM-3 o LAG-3 tras expandir los números de células *in vitro*.

La regulación por incremento de 4-1BB es un indicador de la estimulación de TCR. Se ha observado que después de que los números de células se expandan y en ausencia de estimulación de TCR, la expresión de 4-1BB se pierde. También se ha observado que después de que los números de células se expandan y las células

se cocultiven con la línea de células tumorales autóloga, las células T que habían perdido previamente la expresión de 4-1BB y que se estimulan mediante la línea celular volverán a expresar 4-1BB. Por consiguiente, la expresión de 4-1BB se mide 24 horas después del cocultivo con tumor autólogo como marcador de la estimulación de TCR frente a la línea de células tumorales autóloga.

5

Las células obtenidas a partir de la sangre periférica de cada uno de tres pacientes con melanoma (1913, 3713 y 3289) mediante aféresis se dejaron en reposo durante la noche sin citocinas y se tiñeron. Las células de los pacientes 1913 y 3713 se clasificaron en las siguientes poblaciones de CD3<sup>+</sup> usando anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-PD-1 y TIM-3: CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup> o CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>-</sup> mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células del paciente 3289 se clasificaron en las siguientes poblaciones de CD3<sup>+</sup> usando anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-PD-1, TIM-3 y LAG-3: CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/LAG3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>/LAG3<sup>-</sup> o CD8<sup>+</sup>/TIM-3<sup>-</sup> mediante FACS. Los números de células se expandieron *in vitro* durante 14 días. El día 14, se lavaron las células y se cocultivaron con las correspondientes líneas de células tumorales autólogas (1 x 10<sup>5</sup> células efectoras:1 x 10<sup>5</sup> células diana) y se evaluó la reactividad cuantificando la liberación de IFN-gamma y el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> que expresan 41BB 24 horas después del cocultivo. Los resultados se muestran en las figuras 1A-1C y las tablas 1-3. Tal como se muestra en las figuras 1A-1C y las tablas 1-3, las células clasificadas según la expresión de PD-1 o TIM-3 se enriquecieron en células reactivas con tumores en comparación con células que eran negativas para la expresión de PD-1 o TIM-3, respectivamente.

10

15



TABLA 1

	Células T	TC 1913 Aut.	TC 1913 + W6/32	FrTu#1913 Aut.	FrTu#1913 + W6/32	TC 624 CIITA Alo. A0201	TC 624 CIITA + W6/32	TC 624 CIITA + HLA-DR	TC 2119 A0201	TC2448 A0201	TC1865 A0201	TC1379 A11	TC2301 Alo.	OKT3 (0.1 µg/ml)
Aferesis de T <sub>H</sub> Pre-1913	CD8 <sup>+</sup>	13 (0.3)	<u>342</u> (2.4)	<u>1290</u> (1.4)	46 (0.5)	<u>3942</u> (3.4)	33 (0.7)	<u>2684</u> (2.1)	<u>3099</u> (0.7)	<u>935</u> (1.9)	<u>1723</u> (2.8)	<u>1301</u> (3.6)	328 (1.1)	<b>67357</b> (88.4)
	PD-1 <sup>+</sup>	52 (1.3)	<u>5693</u> (12.1)	<u>2122</u> (14.1)	89 (1.8)	<u>6890</u> (3.0)	15 (0.9)	<u>5610</u> (2.3)	<u>933</u> (2.0)	<u>413</u> (1.1)	174 (1.4)	43 (0.8)	240 (1.0)	<b>53874</b> (86.1)
	PD-1 <sup>-</sup>	18 (0.2)	163 (1.6)	252 (1.0)	38 (0.4)	<u>2047</u> (2.5)	6 (0.3)	<u>1794</u> (1.7)	<u>2457</u> (1.7)	<u>439</u> (2.0)	<u>528</u> (3.1)	158 (2.9)	202 (1.2)	<b>41469</b> (89.1)
	TIM-3 <sup>+</sup>	144 (3.0)	<b>1303</b> (15.8)	<b>1150</b> (8.4)	138 (1.2)	<b>1389</b> (1.3)	10 (0.4)	<b>1346</b> (1.6)	<b>785</b> (2.6)	<b>1124</b> (5.4)	113 (1.9)	50 (2.9)	46 (0.7)	<b>69564</b> (92.2)
TIM-3 <sup>-</sup>	0 (0.1)	244 (1.3)	0 (0.6)	<b>430</b> (1.1)	16 (0.3)	<b>1754</b> (2.1)	1 (0.5)	<b>1169</b> (1.6)	<b>1427</b> (0.7)	<b>1215</b> (1.1)	<b>608</b> (3.1)	<b>370</b> (2.3)	262 (1.1)	<b>52940</b> (92.9)

Poblaciones efectoras expandidas *in vitro* aisladas de sangre periférica del paciente 1913 según la expresión de los marcadores de superficie celular indicados se cocultivaron frente a la línea de células tumorales autólogas (Aut.) (TC1913) y líneas de células tumorales alogénicas (Alo.). Se muestra la reactividad mediante IFN gamma (pg/ml). Los valores entre paréntesis son el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> que regularon por incremento CD137 (41BB) 24 horas (h) después del cocultivo. Las líneas de células tumorales (TC) 624 CIITA, 2119, 2448 y 1865 comparten el alelo HLA\*0201 con TC1913, y TC 1379 comparte A\*11 con TC1913. TC2301 es un control alogénico (no coincidente para todos los HLA) usado como control negativo.

Valores > 300 pg/ml y mayores de dos veces el fondo se consideran positivos y se muestran subrayados y en negrita.

TABLA 2

	Células T	TC3713 Aut.	TC3713 + W6/32	TC624 CIITA HLA-A0201 coincidente A*0201	TC624 CIITA + W6/32 coincidente A*0201	TC624 CIITA + HLA-DR coincidente A*0201	TC2119 coincidente A*0201	TC2119 + W6/32	TC1379 Alo.	TC3460 Alo.	OKT3 (0.1µ/ml)
<b>Aféresis</b>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	25 (0.3)	0 (0)	149 (0.6)	0 (0.1)	102 (0.2)	<b>634</b> (1.2)	0 (0.2)	50 (0.7)	95 (0.1)	<b>24946</b> (71.9)
	PD-1 <sup>+</sup>	<b>713</b> (1.5)	0 (0.7)	68 (0.7)	0 (0.2)	53 (0.3)	186 (0.9)	0 (0.1)	40 (1.2)	186 (0.6)	<b>24044</b> (69.4)
	PD-1-	17 (0.1)	0 (0.1)	93 (0.4)	10 (0.2)	104 (0.4)	216 (0.9)	0 (0.1)	71 (0.7)	42 (0.1)	<b>26901</b> (74.2)
	Tim-3 <sup>+</sup>	32 (0)	5 (0.3)	247 (0.4)	8 (0.2)	198 (0.4)	281 (0.4)	11 (0.2)	26 (0.4)	14 (0.2)	<b>43218</b> (69.9)

Poblaciones efectoras expandidas *in vitro* aisladas de sangre periférica del paciente 3713 según la expresión de los marcadores de superficie celular indicados se cocultivaron frente a la línea de células tumorales autóloga (TC3713) y líneas de células tumorales alogénicas. Se muestra la reactividad mediante IFN gamma (pg/ml). Los valores entre paréntesis son el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> que regularon por incremento CD137 (41BB) 24 h después del cocultivo. Las líneas de células tumorales (TC) 624 CIITA y 2119 comparten el alelo HLA A\*0201 con TC3713. TC1379 y TC 3460 son líneas celulares alogénicas (no coincidentes para todos los HLA usadas como control negativo).

Valores > 300 pg/ml y mayores de dos veces el fondo se consideran positivos y se muestran subrayados y en negrita.

TABLA 3

	Células T	+ TC3289 Aut.	+ TC3289 + W6/32	+ TC3289 (Tratamiento con IFN-γ)	+ TC1379 Alo.	+TC526 Alo.	+ TC526 + W6/32	+ CD4+ CD25- Autólogos normales diana	OKT3 (0.1µ/ml)
Aferesis	CD3+ CD8+	69 (0.4)	44 (0.2)	128 (0.5)	37 (0.3)	121 (0.6)	34 (0.2)	103 (0.8)	<u>93232</u> (87.8)
	PD-1+	<u>1849</u> (5.9)	<u>1013</u> (1.8)	<u>969</u> (3.5)	0 (0.5)	109 (0.8)	0 (0.1)	35 (2.3)	<u>59617</u> (90.9)
	PD-1-	85 (0.4)	58 (0.1)	125 (0.5)	66 (0.4)	164 (1.0)	46 (0.2)	124 (1.0)	<u>70009</u> (88.9)
	LAG-3+	76 (0.8)	50 (0.3)	101 (0.5)	29 (0.4)	71 (1.0)	30 (0.3)	124 (1.5)	<u>84514</u> (78.4)
	LAG-3-	102 (0.6)	57 (0.3)	132 (0.5)	56 (0.5)	95 (0.8)	43 (0.2)	144 (1.2)	<u>70004</u> (88.5)
	Tim-3+	289 (2.4)	118 (0.4)	<u>450</u> (1.6)	128 (1.1)	<u>448</u> (1.4)	111 (0.4)	247 (2.2)	<u>46674</u> (87.8)
	Tim-3-	103 (0.6)	77 (0.2)	147 (0.4)	105 (0.6)	113 (0.8)	63 (0.2)	142 (1.2)	<u>95104</u> (88.0)

Poblaciones efectoras expandidas *in vitro* aisladas de sangre periférica del paciente 3289 según la expresión de los marcadores de superficie celular indicados se cocultivaron frente a la línea de células tumorales autóloga (3289) y líneas de células tumorales alogénicas. Se muestra la reactividad mediante IFN gamma (pg/ml). Los valores entre paréntesis son el porcentaje de células CD3+ CD8+ que regularon por incremento CD137 (41BB) 24 h después del cocultivo. Las líneas de células tumorales (TC) 1379 y TC526 son líneas celulares alogénicas (no coincidentes para todos los HLA) y células CD4+ CD25- autólogas aisladas de sangre periférica usadas como control negativo.

Valores > 300 pg/ml y mayores de dos veces el fondo se consideraran positivos y se muestran subrayados y en negrita.

**Ejemplo 2**

5 Este ejemplo demuestra el reconocimiento de tumores autólogos *in vitro* de células T aisladas de la sangre periférica de pacientes con melanoma y clasificadas según la expresión de PD-1 o TIM-3 tras expandir los números de células *in vitro*.

10 Se obtuvieron células de la sangre periférica del paciente 1913 o paciente 3289 y se clasificaron según la expresión de PD-1 o TIM-3 mediante FACS tal como se describe en el ejemplo 1. Los números de células clasificadas se expandieron durante 14 días *in vitro*. El día 15, se marcaron líneas de células tumorales diana (autólogas y alogénicas) con <sup>51</sup>Cr y se cocultivaron durante 4 horas con las poblaciones de células clasificadas (células efectoras) a las razones mostradas en las figuras 2A-2F. Se determinó la liberación de <sup>51</sup>Cr por triplicado mediante recuento  $\gamma$  y se calculó el porcentaje de lisis específica usando la siguiente fórmula: [(cuentas experimentales por minuto (cpm) - cpm espontáneas)/(cpm máximas - cpm espontáneas)] × 100. Los resultados se muestran en las figuras 2A-2F. Tal como se muestra en las figuras 2A-2F, las células obtenidas a partir de sangre periférica y clasificadas según la expresión de PD-1<sup>+</sup> o TIM-3<sup>+</sup> son capaces de lisar la línea de células tumorales autóloga.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Método de obtención de una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, comprendiendo el método:
- 5 (a) obtener una población a granel de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de una muestra de sangre periférica,
- 10 (b) seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada) y/o TIM-3 (dominio 3 de mucina e inmunoglobulina de células T) a partir de la población a granel, y
- (c) separar las células seleccionadas en (b) de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores;
- 15 opcionalmente en el que el método comprende además:
- (i) cultivar la población de células enriquecida obtenida en (c) en presencia de una cualquiera o más de TWS119 (3-[[6-(3-aminofenil)-7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il]oxi]fenol), interleucina (IL-21), IL-12, IL-15, IL-7, factor de crecimiento transformante (TGF) beta e inhibidor de AKT (AKTi),
- 20 (ii) estimular la población de células enriquecida obtenida en (c) con un antígeno tumoral y/o con células T tumorales autólogas, y/o
- (iii) transducir o transfectar las células de la población enriquecida obtenida en (c) con una secuencia de nucleótidos que codifica para uno cualquiera o más de IL-12, IL-7, IL-15, IL-2, IL-21, mir155 y ARNip anti-PD-1.
- 25 2. Método de obtención de una composición farmacéutica que comprende una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, comprendiendo el método:
- 30 (a) obtener una población a granel de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de una muestra de sangre periférica,
- (b) seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que también expresan PD-1 y/o TIM-3 a partir de la población a granel,
- 35 (c) separar las células seleccionadas en (b) de las células no seleccionadas para obtener una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores, y
- (d) combinar la población de células enriquecida en células T reactivas con tumores con un portador farmacéuticamente aceptable para obtener una composición farmacéutica que comprende una población de células enriquecida en células T reactivas con tumores;
- 40 opcionalmente en el que el método comprende además:
- (i) cultivar la población de células enriquecida obtenida en (c) en presencia de uno cualquiera o más de TWS119, interleucina (IL-21), IL-12, IL-15, IL-7, factor de crecimiento transformante (TGF) beta e inhibidor de AKT (AKTi),
- (ii) estimular la población de células enriquecida obtenida en (c) con un antígeno tumoral y/o con células T tumorales autólogas, y/o
- 50 (iii) transducir o transfectar las células de la población enriquecida obtenida en (c) con una secuencia de nucleótidos que codifica para uno cualquiera o más de IL-12, IL-7, IL-15, IL-2, IL-21, mir155 y ARNip anti-PD-1.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que (b) comprende seleccionar específicamente células T CD8<sup>+</sup> que son (i) TIM-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>, (ii) TIM-3<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup> o (iii) TIM-3<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup> a partir de la población a granel.
- 55 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la población de células enriquecida en células T reactivas con tumores se obtiene sin examinar el reconocimiento de tumores autólogos.
- 60 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la población a granel de células T no se estimula inespecíficamente antes de (b).
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además expandir los números de células T en la población de células enriquecida obtenida en (c).

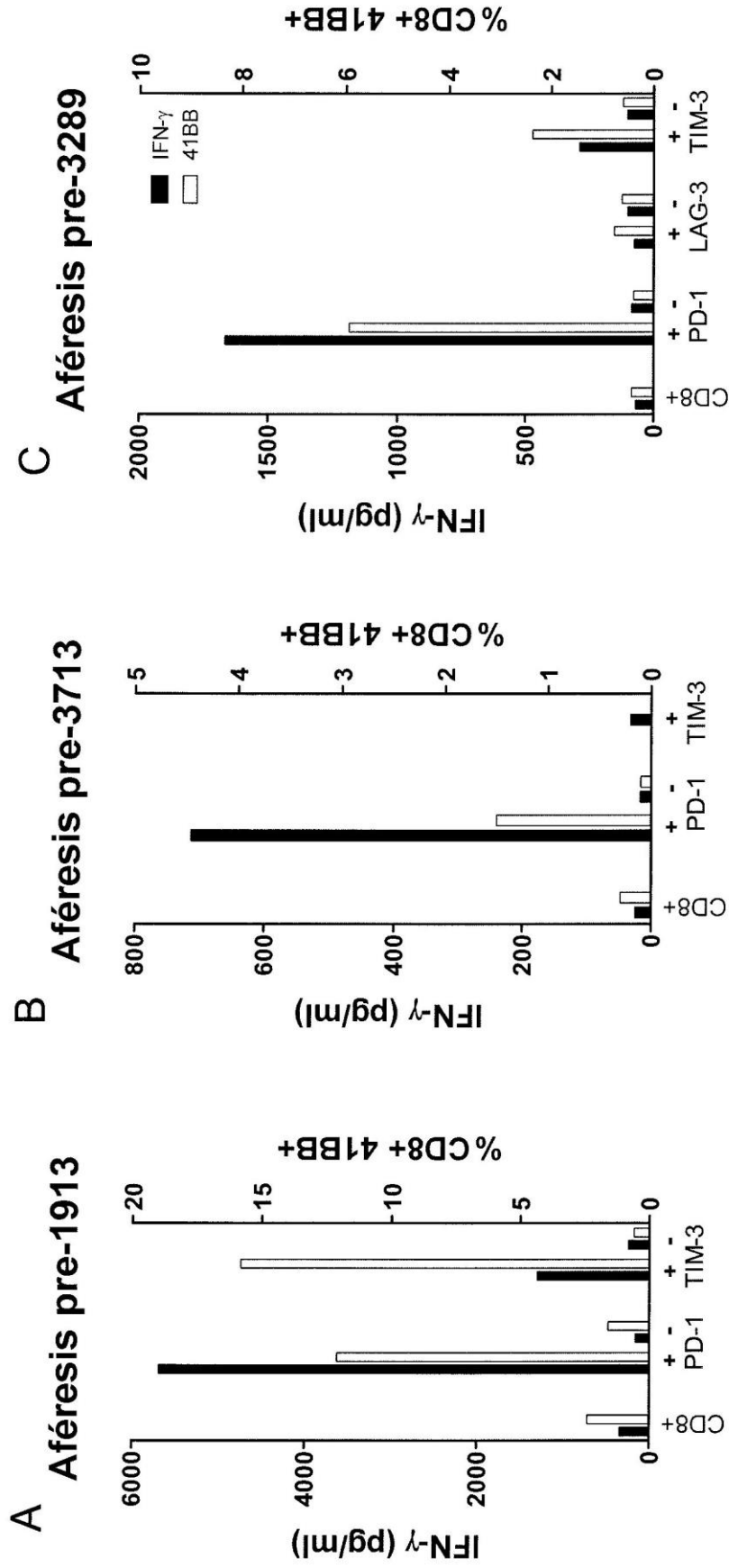


FIG. 1

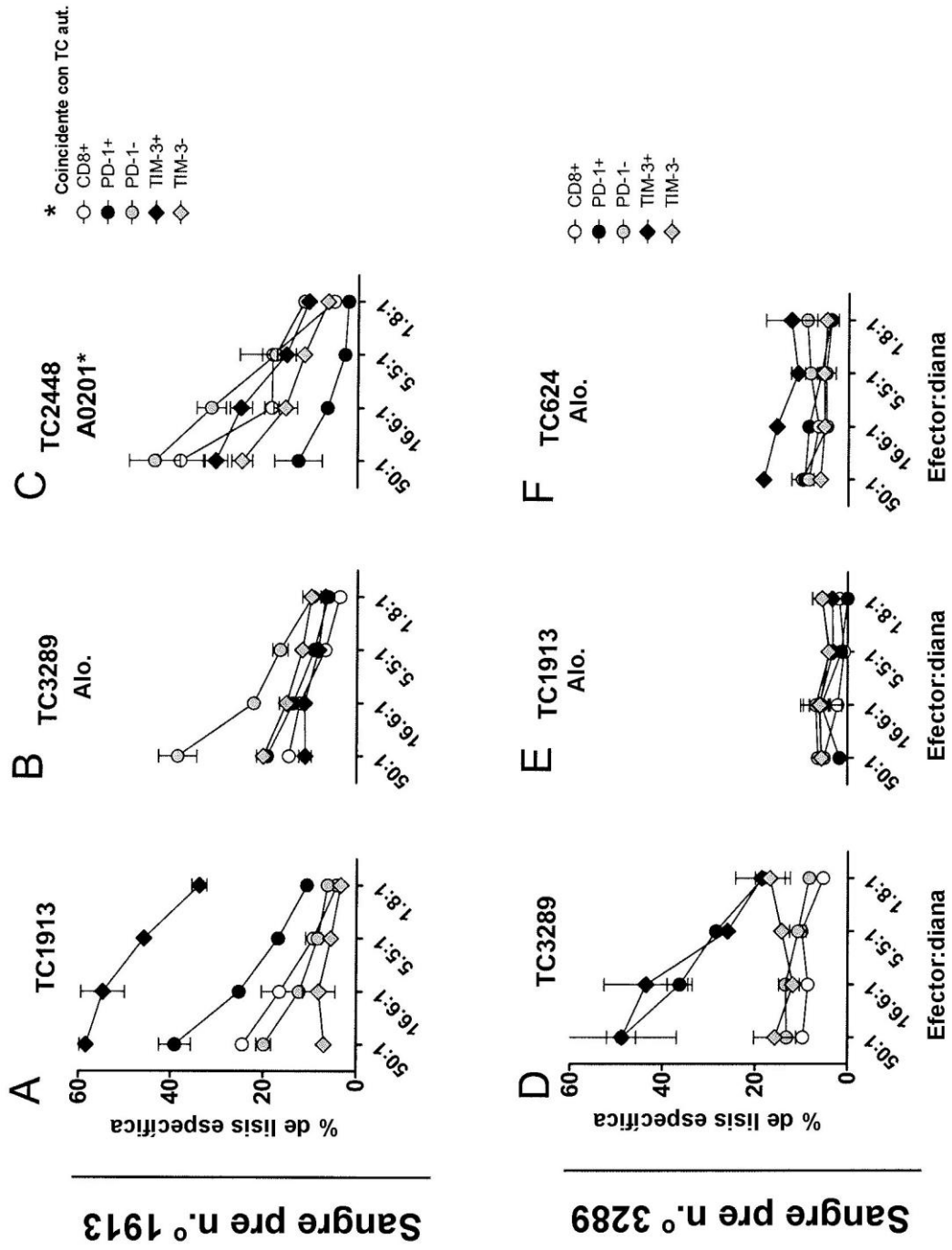


FIG. 2