

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 407**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2015 PCT/US2015/021759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15143328**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2015 E 15765854 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3119477**

54 Título: **Linfocitos infiltrantes de tumor para terapia celular adoptiva**

30 Prioridad:

20.03.2014 US 201461955970 P

31.03.2014 US 201461973002 P

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

30.07.2020

73 Titular/es:

**H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND
RESEARCH INSTITUTE, INC. (50.0%)**

12902 Magnolia Drive

Tampa, FL 33612, US y

UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA (50.0%)

72 Inventor/es:

SARNAIK, AMOD A.;

PILON-THOMAS, SHARI;

MCLAUGHLIN, MARK y

LIU, HAO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 776 407 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

Linfocitos infiltrantes de tumor para terapia celular adoptiva

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional US nº 61/955.970, presentada el 20 de marzo de 2014, y de la solicitud de patente provisional US nº 61/973.002, presentada el 31 de marzo de 2014.

10 ANTECEDENTES

La terapia celular adoptiva (TCA) con linfocitos infiltrantes de tumor (LIT) es una forma prometedora de inmunoterapia basada en células T. La preparación de LIT implica la resección quirúrgica y la expansión de los LIT a partir de tumores de melanoma. Tras la expansión adecuada de LIT, los pacientes se someten a quimioterapia de reducción de linfocitos y transferencia adoptiva de LIT seguida de una dosis elevada de IL-2. La rama quirúrgica del National Cancer Institute ha liderado en este tratamiento para el melanoma metastásico e informa de una tasa de respuesta de aproximadamente 50% en pacientes tratados, alcanzando un ~20% de los pacientes respuestas completas duraderas (Rosenberg SA, et al. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 17(13):4550-7, 2011). La impresionante durabilidad de las respuestas a la TCA es una característica distintiva de este tratamiento y aparentemente es superior a los tratamientos actuales para el melanoma. La TCA depende de la infiltración de las células T en los tumores antes de la recolección, expansión ex vivo con éxito de los LIT y una función efectora antitumoral potente después de la transferencia. Aunque la TCA de LIT resulta eficaz para el melanoma, las tasas de respuesta duradera requieren una mejora adicional. El acortamiento del periodo de expansión para el crecimiento inicial de los LIT y la mejora de la especificidad tumoral de los LIT expandidos podría incrementar las tasas de respuesta en pacientes tratados con LIT autólogos. Dudley et al. (J. Clin. Onco, 01.04.2005, p2346-2357) enseñan la utilización de los LIT para la terapia del melanoma metastásico.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA

30 Se dan a conocer composiciones y métodos para la expansión ex vivo de linfocitos infiltrantes de tumor para la utilización en terapia celular adoptiva (TCA). En algunas realizaciones, los métodos implican el cultivo de los linfocitos para producir linfocitos expandidos en un medio de cultivo que comprende un agonista de receptor de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) en una cantidad eficaz para mejorar la especificidad tumoral de los linfocitos expandidos. En algunas realizaciones, los métodos implican cultivar los linfocitos para producir linfocitos expandidos en un medio de cultivo que comprende un péptido estimulante o peptidomimético. En algunas realizaciones, el peptidomimético es un peptoide o un híbrido péptido-peptoide. En algunas realizaciones, el peptoide o híbrido péptido-peptoide resulta estabilizado por un hidrocarburo grapa.

40 Se dan a conocer además métodos de tratamiento del cáncer que utilizan linfocitos infiltrantes de tumor expandidos mediante los métodos dados a conocer.

En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido. En algunos casos, el cáncer es un melanoma, cáncer ovárico, cáncer de mama y cáncer colorrectal. El cáncer puede ser metastásico, recurrente o una combinación de los mismos.

45 El agonista de TLR es, en algunas realizaciones, un ligando de un TLR seleccionado del grupo que consiste en TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9. Por ejemplo, el agonista de TLR puede ser un ligando seleccionado del grupo que consiste en Pam3CSK4, Pam3CSK4, poli I:C, Ribomunyl y CpG ODN.

50 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se proporcionan en los dibujos adjuntos y en la descripción, posteriormente. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 Las figuras 1A a 1D muestran ejemplos de cuerpos peptoides.
 La figura 2 muestra un esquema de preparación de un cuerpo peptoide que comprende un conector que está unido a una resina y un segundo conector que comprende una secuencia peptoide-peptoide.
 La figura 3 muestra un esquema de preparación de un cuerpo peptoide que comprende un conector que está unido a una resina y un segundo conector que es un promotor de giro beta.
 60 Las figuras 4A a 4C muestran ejemplos de híbridos peptoide-péptido grapados.
 La figura 5 muestra un ejemplo de una placa de escaneo posicional de bibliotecas.
 La figura 6 muestra un ejemplo de un esquema de reacción para estabilizar el andamiaje de híbrido peptoide-péptido de tipo horquilla beta cíclica utilizando un grupo meta-xilenilo.
 La figura 7 muestra un ejemplo de un esquema de reacción para estabilizar el andamiaje de híbrido peptoide-péptido de tipo horquilla beta cíclica, mediante el grapado de cadenas laterales propargilo que se encuentran en cadenas laterales peptídicas más proximales.
 65

La figura 8 muestra un ejemplo de un esquema de reacción para estabilizar el andamiaje de híbrido peptoide-péptido de tipo horquilla beta cíclica utilizando una azida y un alquino.

La figura 9 muestra un ejemplo de un esquema de reacción para estabilizar el andamiaje de híbrido peptoide-péptido de tipo horquilla beta cíclica utilizando metatesis de cierre de anillo (MCA).

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA

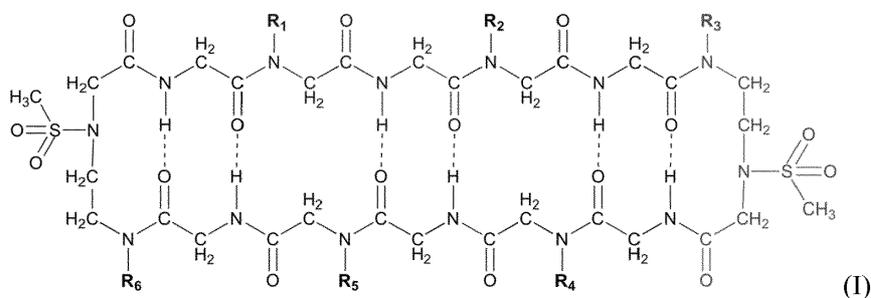
La transferencia celular adoptiva (TCA) es una forma muy eficaz de inmunoterapia, e implica la transferencia de células inmunitarias con actividad antitumoral a pacientes de cáncer. La TCA es un enfoque terapéutico que implica la identificación, *in vitro*, de linfocitos con actividad antitumoral, la expansión *in vitro* de dichas células a un número elevado y su infusión en el huésped portador de cáncer. Los linfocitos utilizados para la transferencia adoptiva pueden derivarse del estroma de tumores resecaados (linfocitos infiltrantes de tumor, o LIT). También pueden derivarse de sangre si se manipulan genéticamente para expresar receptores de células T (RCT) antitumorales, o de receptores de antígenos quiméricos (RAQ), enriquecidos con cultivos de células tumorales de linfocitos mixtos (CCTLM), o clonarse utilizando células presentadoras de antígenos autólogos y péptidos derivados de tumores. La TCA en la que los linfocitos se originan en el huésped portador de cáncer que debe infundirse se denomina TCA autóloga. El documento nº US 2011/0052530 se refiere a un método para llevar a cabo terapia celular adoptiva para estimular la regresión del cáncer, principalmente para el tratamiento de pacientes que sufren de melanoma metastásico.

Se dan a conocer composiciones y métodos para la expansión *ex vivo* de linfocitos infiltrantes de tumor (LIT) para la utilización en la TCA. En algunas realizaciones, los métodos implican el cultivo de los linfocitos para producir linfocitos expandidos en un medio de cultivo que comprende un agonista de receptor de tipo Toll (TLR) en una cantidad eficaz para mejorar la especificidad tumoral de los linfocitos expandidos. El agonista de TLR es, en algunas realizaciones, un ligando para un TLR seleccionado del grupo que consiste en TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9. Por ejemplo, el agonista de TLR puede ser un ligando seleccionado del grupo que consiste en Pam3CSK4, poli I:C, Ribomunyl y CpG ODN.

En otras realizaciones, los métodos implican cultivar los linfocitos para producir linfocitos expandidos en un medio de cultivo que comprende un péptido o peptidomimético en una cantidad eficaz para mejorar la especificidad tumoral de los linfocitos expandidos. En algunas realizaciones, el peptidomimético es un peptoide o un híbrido péptido-peptoide. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el peptoide o híbrido péptido-peptoide resulta estabilizado por un hidrocarburo grapa.

La parte peptoide puede proporcionar resistencia a la proteólisis y la parte péptido de los híbridos peptoide-péptido puede proporcionar la capacidad de formar la estructura secundaria de tipo horquilla beta. Estas dos contribuciones pueden resultar en un híbrido que es un buen candidato a fármaco para terapias en las que la proteólisis es generalmente una limitación de la terapia. Tal como se da a conocer en la presente memoria, estos híbridos péptido-peptoide también pueden utilizarse para la expansión *ex vivo* de linfocitos infiltrantes de tumor (LIT) para la utilización en la TCA.

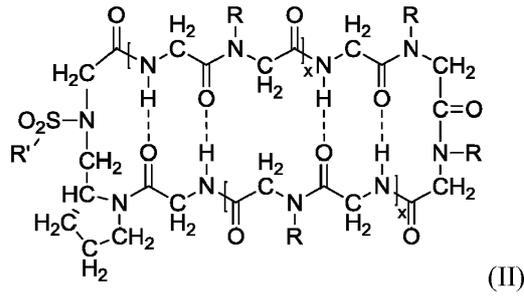
Se describen ejemplos de híbrido péptido-peptoide en el documento nº WO 2013/192628, de McLaughlin et al. Los cuerpos peptoides en el documento nº WO 2013/192628 son híbridos peptoide-péptido cíclicos, que pueden proporcionar una biblioteca de andamiaje utilizando un enfoque combinatorial por parejas. Los híbridos peptoide-péptido cíclicos pueden adoptar una estructura secundaria de tipo horquilla beta. Este diseño de tipo horquilla beta cíclica resulta de la alternancia de las subunidades péptido-peptoide en dos cadenas beta antiparalelas. Por ejemplo, el híbrido péptido-peptoide dado a conocer puede presentar la estructura química mostrada, por ejemplo, en la fórmula I:



o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que R₁-R₆ son independientemente grupos orgánicos.

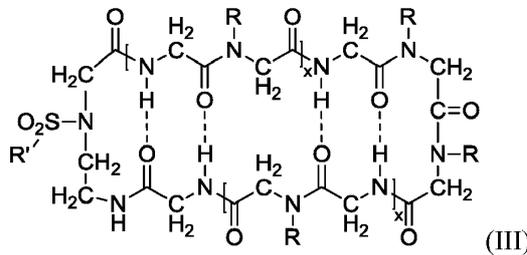
En algunas realizaciones, los híbridos peptoide-péptido cíclicos presentan la estructura química mostrada en la fórmula II:

55



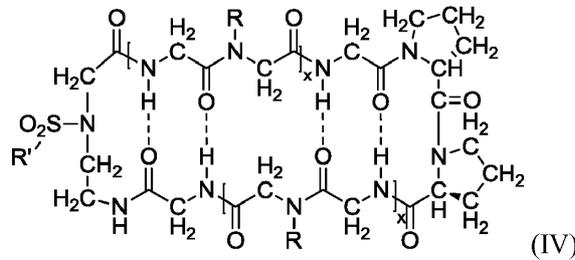
- 5 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que los grupos R son independientemente grupos orgánicos, R' es un grupo orgánico o un grupo de puente orgánico con una resina u otro sustrato, y x es 1 a 3.

En algunas realizaciones, los híbridos peptoides-péptidos cíclicos presentan la estructura química mostrada en la fórmula III:



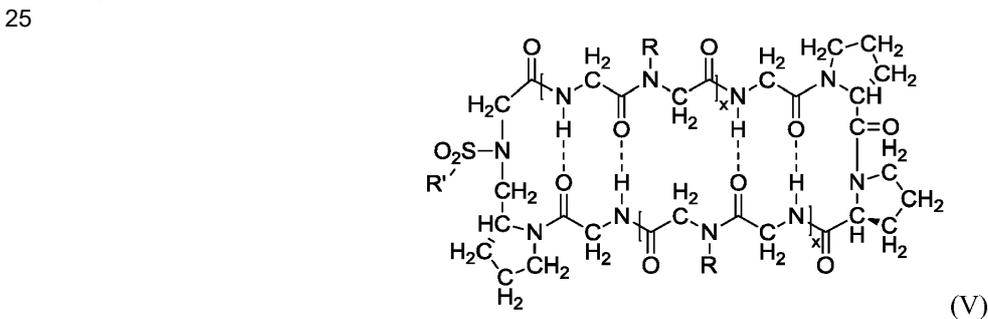
- 10 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que los grupos R son independientemente grupos orgánicos, R' es un grupo orgánico o un grupo de puente orgánico con una resina u otro sustrato, y x es 1 a 3.

- 15 En algunas realizaciones, los híbridos peptoides-péptidos cíclicos presentan la estructura química mostrada en la fórmula IV:



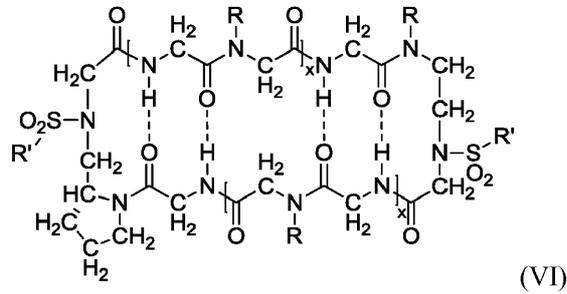
- 20 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que los grupos R son independientemente grupos orgánicos, R' es un grupo orgánico o un grupo de puente orgánico con una resina u otro sustrato, y x es 1 a 3.

En algunas realizaciones, los híbridos peptoides-péptidos cíclicos presentan la estructura química mostrada en la fórmula V:



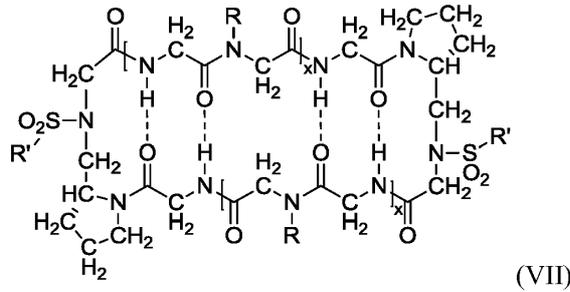
- 25 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que los grupos R son independientemente grupos orgánicos, R' es un grupo orgánico o un grupo de puente orgánico con una resina u otro sustrato, y x es 1 a 3.

En algunas realizaciones, los híbridos peptoides-péptidos cíclicos presentan la estructura química mostrada en la fórmula VI:



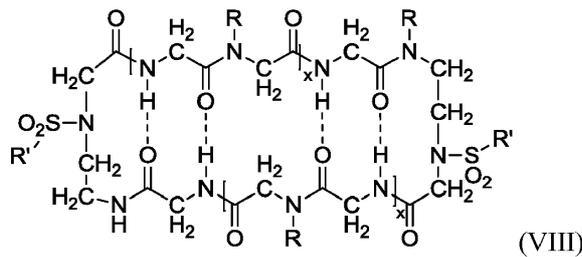
5 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que los grupos R son independientemente grupos orgánicos, R' es independientemente un grupo orgánico o un grupo de puente orgánico con una resina u otro sustrato, y x es 1 a 3.

10 En algunas realizaciones, los híbridos peptoides-péptidos cíclicos presentan la estructura química mostrada en la fórmula VII:



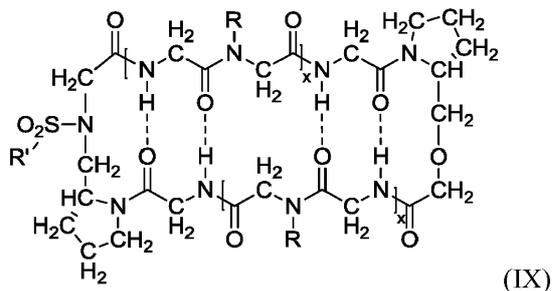
15 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que los grupos R son independientemente grupos orgánicos, R' es independientemente un grupo orgánico o un grupo de puente orgánico con una resina u otro sustrato, y x es 1 a 3.

20 En algunas realizaciones, los híbridos peptoides-péptidos cíclicos presentan la estructura química mostrada en la fórmula VIII:



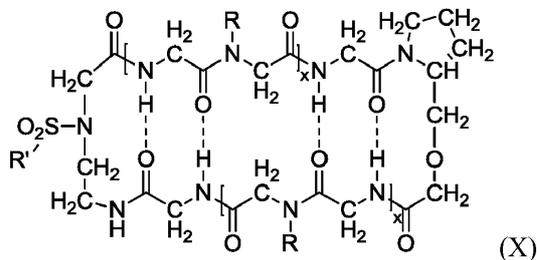
25 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que los grupos R son independientemente grupos orgánicos, R' es independientemente un grupo orgánico o un grupo de puente orgánico con una resina u otro sustrato, y x es 1 a 3.

30 En algunas realizaciones, los híbridos peptoides-péptidos cíclicos presentan la estructura química mostrada en la fórmula IX:



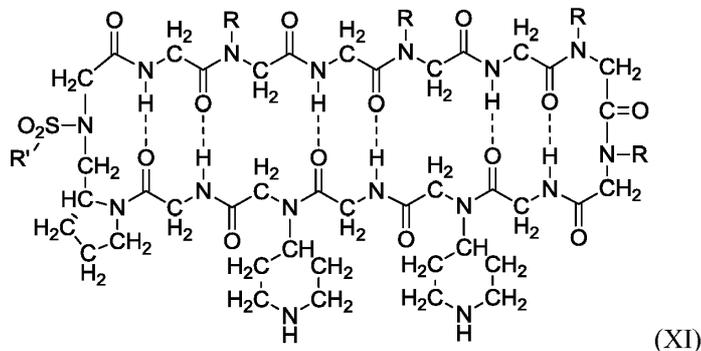
5 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que los grupos R son independientemente grupos orgánicos, R' es un grupo orgánico o un grupo de puente orgánico con una resina u otro sustrato, y x es 1 a 3.

En algunas realizaciones, los híbridos peptoides-péptidos cíclicos presentan la estructura química mostrada en la fórmula X:

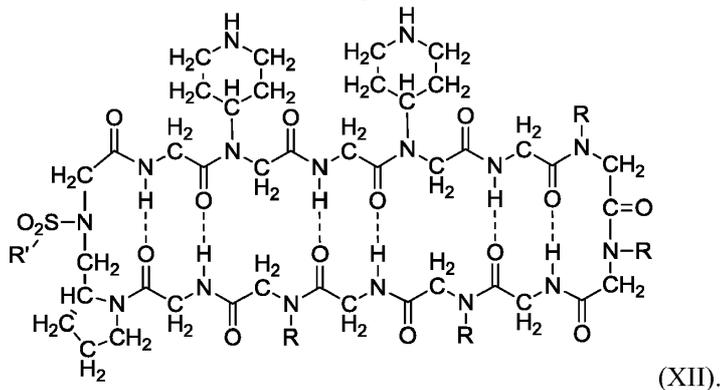


10 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que los grupos R son independientemente grupos orgánicos, R' es un grupo orgánico o un grupo de puente orgánico con una resina u otro sustrato, y x es 1 a 3.

15 En algunas realizaciones, los grupos R de por lo menos dos secuencias contiguas de peptoides-glicina son grupos 4-piperidinilo, por ejemplo un compuesto de fórmula II en la que x es 2:



o



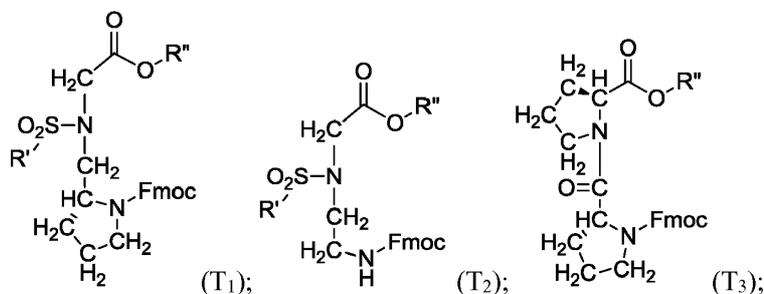
20 Los grupos R de los híbridos peptoides-péptidos cíclicos de fórmulas I a XII, anteriormente, pueden ser prácticamente cualquier estructura de manera que no contenga una fracción que rompa los enlaces de hidrógeno complementarios

de la estructura de hoja beta dentro del híbrido peptoide-péptido cíclico. El grupo R puede ser equivalente a las cadenas laterales de aminoácidos, la parte no amina de un aminoácido o una parte no amina modificada de un aminoácido. El grupo R puede ser un azúcar, tal como un monosacárido o disacárido, o un ácido graso o variación modificada del mismo. El grupo R puede ser, aunque sin limitación, un grupo alquilo C₁-C₁₂, hidroxialquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, alquilo de ácido carboxílico C₁-C₁₂, alquiloxialquilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂, hidroxialquenilo C₂-C₁₂, aminoalquenilo C₂-C₁₂, alquenilo de ácido carboxílico C₁-C₁₂, alquiloxialquenilo C₃-C₁₄, arilo C₆-C₁₄, hidroxiarilo C₆-C₁₄, aminoarilo C₆-C₁₄, arilo de ácido carboxílico C₆-C₁₄, alquiloxiarilo C₇-C₁₅, heteroarilo C₄-C₁₄, hidroxiheteroarilo C₄-C₁₄, aminoheteroarilo C₄-C₁₄, heteroarilo de ácido carboxílico C₄-C₁₄, alcoxiheteroarilo C₅-C₁₅, alquilarilo C₇-C₁₅, hidroxialquilarilo C₇-C₁₅, aminoalquilarilo C₇-C₁₅, alquilarilo de ácido carboxílico C₇-C₁₅, alcoxialquilarilo C₈-C₁₅, o un producto químicamente transformado de cualquier de dichos grupos R, tales como ésteres, tioésteres, tioles, amidas o sulfonamidas, en los que los grupos alquilo puede ser lineales, ramificados, múltiplemente ramificados, cíclicos o policíclicos. Por ejemplo, R puede ser un residuo de una amina primaria, que puede ser, aunque sin limitarse a ellos, grupos de la incorporación de 4-aminopiperidina, etanolamina, alilamina, 1,4-diaminobutano, piperperonilamina, 4-(2-aminoetil)benceno, isobutilamina, triptamina, 4-morfolinoanilina, 5-amino-2-metoxipiridina, (R)-metilbencilamina, 1-(2-aminopropil)-2-pirrolidinona, furfurilamina, bencilamina, 4-clorobencilamina, 4-metoxibencilamina, metoxietilamina, ácido 2-aminoadípico, N-etilasarparagina, ácido 3-aminoadípico, hidroxilisina, beta-alanina, alo-hidroxilisina, ácido propiónico, ácido 2-aminobutírico, 3-hidroxi prolina, ácido 4-aminobutírico, 4-hidroxi prolina, ácido piperidínico, ácido 6-aminocaproico, isodesmosina, ácido 2-aminoheptanoico, alo-isoleucina, ácido 2-aminoisobutírico, N-metilglicina, ácido 3-aminoisobutírico, N-metilisoleucina, ácido 2-aminopimélico, 6-N-metil-lisina, ácido 2,4-diaminobutírico, N-metilvalina, desmosina, norvalina, ácido 2,2'-diaminopimélico, norleucina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ornitina, N-etilglicina, o equivalentes protegidos de los mismos, como una unidad N-R peptoide en el híbrido peptoide-péptido cíclico.

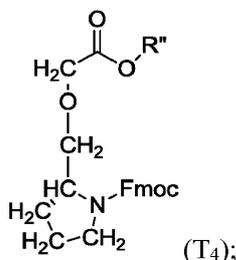
En algunas realizaciones, los híbridos peptoide-péptido pueden producirse sobre un soporte sólido, tal como una resina. A continuación, los híbridos pueden escindirse de la resina de soporte para la utilización en los métodos dados a conocer. Las figuras 1 y 2 ilustran híbridos peptoide-péptido ejemplares como intermediarios unidos a resina.

Híbridos peptoide-péptido ejemplares

Realización 1: un híbrido peptoide-péptido con una conformación de tipo horquilla beta, que comprende una pluralidad de secuencias de peptoide-péptido alternantes, presentando cada una por lo menos un residuo peptoide y un residuo aminoácido, en la que las secuencias de peptoide-péptido forman por lo menos dos cadenas beta antiparalelas entre una pluralidad de conectores, y en la que por lo menos un conector es un promotor de giro beta. Realización 2: el híbrido según la realización 1, en el que por lo menos uno de los conectores es el residuo aminoácido de la condensación del precursor de conector de estructura:



o



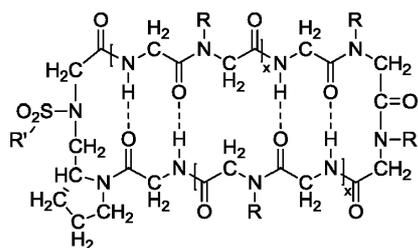
en la que R' es un grupo orgánico, o un grupo de puente orgánico unido a una resina u otro sustrato, y R'' es H o un grupo protector de ácido carboxílico.

Realización 3: el híbrido según la realización 2, en la que R'' es t-butilo, alilo o bencilo.

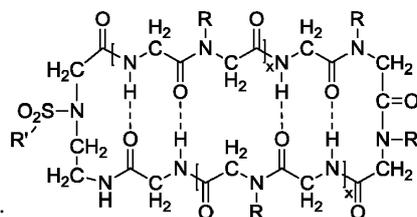
Realización 4: el híbrido según la realización 2, en la que el grupo de puente orgánico unido a una resina u otro sustrato comprende un grupo de puente -NH(CH₂)₂-

Realización 5: el híbrido según la realización 1, en el que uno de los conectores son dos residuos peptoides.

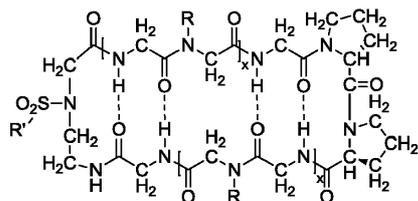
Realización 6: el híbrido según la realización 1, en el que el híbrido peptoide-péptido cíclico es:



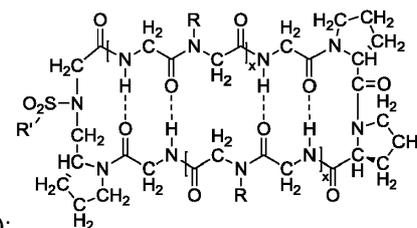
(II);



(III);

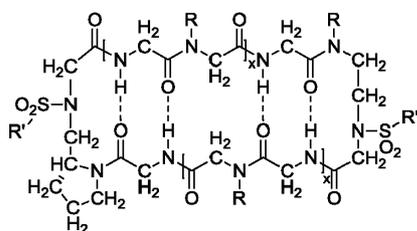


(IV);

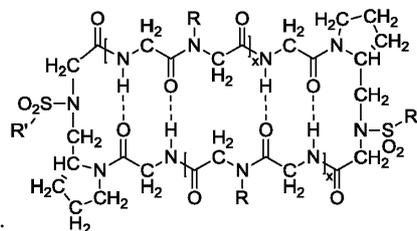


(V);

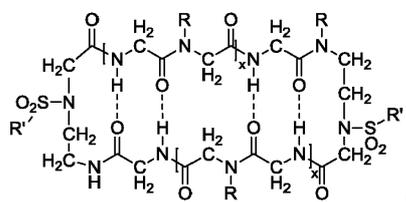
5



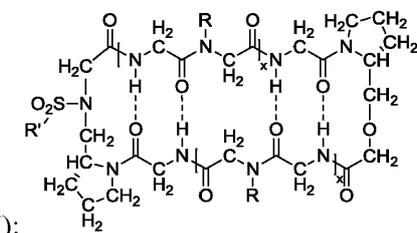
(VI);



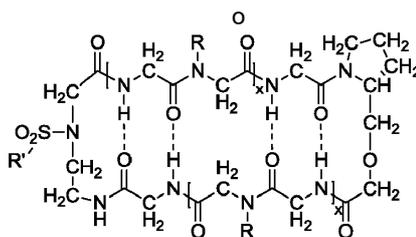
(VII);



(VIII);



(IX);



(X),

10

en el que los grupos R son independientemente grupos orgánicos, R' es independientemente un grupo orgánico o un grupo de puente orgánico unido a una resina y x es 1 a 3.

15 Realización 7: el híbrido según la realización 6, en el que R es independientemente alquilo C₁-C₁₂, hidroxialquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, alquilo de ácido carboxílico C₁-C₁₂, alquioxialquilo C₂-C₁₂, alquenilo C₂-C₁₂, hidroxialquenilo C₂-C₁₂, aminoalquenilo C₂-C₁₂, alquenilo de ácido carboxílico C₁-C₁₂, alquioxialquenilo C₃-C₁₄, arilo C₆-C₁₄, hidroxiarilo C₆-C₁₄, aminoarilo C₆-C₁₄, arilo de ácido carboxílico C₆-C₁₄, alquioxiarilo C₇-C₁₅, heteroarilo C₄-C₁₄, hidroxiheteroarilo C₄-C₁₄, aminoheteroarilo C₄-C₁₄, heteroarilo de ácido carboxílico C₄-C₁₄, alcojiheteroarilo C₅-C₁₅, alquilarilo C₇-C₁₅, hidroxialquilarilo C₇-C₁₅, aminoalquilarilo C₇-C₁₅, alquilarilo de ácido carboxílico C₇-C₁₅, alcoxialquilarilo C₈-C₁₅, o cualquier estructura química transformada a partir de los mismos.

20 Realización 8: el híbrido según la realización 7, en el que la estructura químicamente transformada comprende un éster, tioéster, tiol, amida o sulfonamida.

25 Realización 9: el híbrido según la realización 6, en la que R es independientemente un residuo de una amina primaria: 4-aminopiperidina, etanolamina, alilamina, 1,4-diaminobutano, piperponilamina, 4-(2-aminoetil)benzeno, isobutilamina, triptamina, 4-morfolinoanilina, 5-amino-2-metoxipiridina, (R)-metilbencilamina, 1-(2-aminopropil)-2-pirrolidinona, furfuralilamina, bencilamina, 4-clorobencilamina, 4-metoxibencilamina, metoxietilamina. Ácido 2-aminoadípico, N-etilaspargina, ácido 3-aminoadípico, hidroxilisina, beta-alanina, alo-hidroxilisina, ácido propiónico, ácido 2-aminobutírico, 3-hidroxiprolina, ácido 4-aminobutírico, 4-hidroxiprolina, ácido piperidínico, ácido

6-aminocaproico, isodesmosina, ácido 2-aminoheptanoico, alo-isoleucina, ácido 2-aminoisobutírico, N-metilglicina, ácido 3-aminoisobutírico, N-metilisoleucina, ácido 2-aminopimélico, 6-N-metil-lisina, ácido 2,4-diaminobutírico, N-metilvalina, desmosina, norvalina, ácido 2,2'-diaminopimélico, norleucina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ornitina, N-etilglicina, o cualesquiera equivalentes protegidos de los mismos.

5 Realización 10: el híbrido según la realización 6, en el que por lo menos un R es un residuo de 4-aminopiperidina.
Realización 11: el híbrido según la realización 11, en el que la totalidad de los residuos aminoácidos son residuos de glicina.

10 Los híbridos peptoide-híbrido pueden estabilizarse adicionalmente mediante entrecruzamiento entre las cadenas laterales de aminoácidos, y/o las N-sustituciones en glicinas y/o la ciclización del esqueleto. Dichos peptoides se denominan en la presente memoria "peptoides grapados", mientras que dichos híbridos peptoide-péptido se denominan en la presente memoria "híbridos peptoide-péptido grapados".

15 El grapado de peptoides o híbridos peptoide-péptido implica enlaces cadena lateral-a-cadena lateral y/o la ciclización del esqueleto para estabilizar los peptoides o los híbridos peptoide-péptido. De esta manera, la presente invención extiende el enfoque de estabilizar los péptidos utilizando enlaces de cadenas laterales estabilizados con peptoides o híbridos peptoide-péptido estabilizadores.

20 Para el propósito de la presente invención, la expresión "cadena lateral" incluye una cadena lateral en el aminoácido, así como la fracción unida al átomo de N de la glicina N-sustituída.

25 Pueden diseñarse varios enlaces cadena lateral-cadena lateral posibles (en lo sucesivo denominados entrecruzamiento intramolecular). El entrecruzamiento intramolecular entre las dos cadenas laterales de los peptoides o los híbridos peptoide-péptido de la presente invención puede estar mediado por reacciones químicas entre las cadenas laterales que también pueden implicar productos químicos adicionales.

30 Por ejemplo, el entrecruzamiento intramolecular puede estar mediado por una fracción química que no es una parte de las cadenas laterales y en el que las cadenas laterales se conectan entre sí mediante la fracción química. Un ejemplo de la fracción química que forma el entrecruzamiento intramolecular se describe en las figuras 6 a 9.

35 En algunas realizaciones, el entrecruzamiento intramolecular se establece mediante el enfoque MCA (metatesis de cierre de anillo) según Aileron o una reacción Click (p.ej., la cicloadición 3+2 catalizada por cobre) descrita en la patente US nº 5.811.515.

Un ejemplo de entrecruzamiento intramolecular mediada por el enfoque de MCA se describe en la figura 9.

40 En una realización adicional, el entrecruzamiento intramolecular entre las dos cadenas laterales se establece mediante la formación de un enlace químico, por ejemplo mediante una reacción de condensación, entre los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales. Una reacción de condensación es una reacción química en la que dos moléculas o fracciones (grupos funcionales) se combinan mediante un enlace químico y la reacción implica la pérdida de una o más moléculas más pequeñas. Los ejemplos de reacción de condensación entre las cadenas laterales que pueden utilizarse para producir el entrecruzamiento intramolecular según la presente invención son bien conocidos por el experto ordinario en la materia y dichas realizaciones se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

45 Se muestran ejemplos adicionales de peptoides grapados con determinados enlaces cruzados intramoleculares en las figuras 4A-4C.

50 Se dan a conocer ejemplos adicionales de enlaces cruzados en péptidos en las patentes estadounidenses nº 8.592.377, nº 8.324.428, nº 8.198.405, nº 7.786.072, nº 7.723.469 y nº 7.192.713. El experto ordinario en la materia podrá contemplar la utilización de diversos enlaces cruzados descritos en dichos documentos de patente en la preparación de los peptoides grapados e híbridos peptoide-péptido grapados según la presente invención, y dichas realizaciones se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

55 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención proporciona un peptoide grapado que comprende una pluralidad de glicinas N-sustituídas, en las que por lo menos dos de las glicinas N-sustituídas están unidas entre sí mediante entrecruzamiento intramolecular y en las que la longitud y geometría del entrecruzamiento intramolecular proporciona estabilidad al peptoide.

60 En algunos casos, el híbrido peptoide-péptido grapado puede comprender una pluralidad de aminoácidos y una pluralidad de glicinas N-sustituídas, en las que por lo menos dos residuos de la pluralidad de aminoácidos y de la pluralidad de glicinas N-sustituídas están unidos entre sí mediante un enlace cruzado intramolecular y en las que la longitud y geometría del enlace cruzado intramolecular proporciona estabilidad al híbrido peptoide-péptido.

65 En una realización, se unen dos residuos de glicina N-sustituídos o dos residuos aminoácidos entre sí mediante un

enlace cruzado. En otra realización, se une un residuo de glicina N-sustituido a un residuo aminoácido mediante un enlace cruzado.

5 En una realización adicional, el híbrido peptoide-péptido grapado es un híbrido peptoide-péptido cíclico. Un híbrido peptoide-péptido cíclico comprende una pluralidad de secuencias de peptoide-péptido alternantes, presentando cada una por lo menos un residuo peptoide y un residuo aminoácido, en el que las secuencias de peptoide-péptido forman por lo menos dos cadenas beta antiparalelas.

10 En algunas realizaciones, el enlace cruzado intramolecular es un enlace cruzado totalmente de hidrocarburos.

En algunas realizaciones, el peptoide o el híbrido peptoide-péptido comprende más de un enlace cruzado intramolecular, por ejemplo, dos, tres o cuatro enlaces cruzados intramoleculares.

15 En algunas realizaciones, los enlaces cruzados entre dos o más residuos aminoácidos, o residuos de glicina N-sustituídos situados en la misma cara de una hoja beta, proporcionando de esta manera estabilidad al peptoide o híbrido peptoide-péptido. En una realización adicional, los enlaces cruzados intramoleculares se encuentran entre dos o más residuos aminoácidos, o residuos de glicina N-sustituídos situados en los residuos de una hoja beta, proporcionando de esta manera estabilidad al peptoide o híbrido peptoide-péptido.

20 En algunas realizaciones, la cadena lateral puede seleccionarse de alquileo cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, cíclico o acíclico sustituido, ramificado o no ramificado; alquilenilo cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; alquilenilo cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; heteroalquileo cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; heteroalquilenilo cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; heteroalquilenilo cíclico o acíclico, ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido; arileno sustituido o no sustituido; heteorarileno sustituido o no sustituido, o acileno sustituido o no sustituido.

30 Ejemplos adicionales de cadenas laterales y enlaces cruzados que pueden aplicarse en la presente invención se dan a conocer en, por ejemplo, la patente US nº 8.592.377, entre la columna 37, línea 26 y la columna 43, línea 14; patente US nº 8.198.405, columna 3, línea 54 a columna 10, línea 2 y columna 25, línea 14 a columna 26, línea 21; patente US nº 7.786.072, columna 5, línea 44 a columna 9, línea 43 y columna 11, línea 16 a columna 12, línea 8; patente US nº 7.723.469, columna 5, línea 30 a columna 9, línea 12 y columna 24, línea 60 a columna 26, línea 3, y patente US nº 7.192.713, columna 4, línea 26 a columna 9, línea 45 y columna 11, línea 23 a columna 12, línea 18.

35 Los peptoides e híbridos peptoide-péptido grapados e híbridos peptoide-péptido cíclicos grapados de la presente invención también pueden contener opcionalmente además sustituciones en las cadenas laterales de los residuos aminoácidos y/o los residuos de glicina N-sustituídos, en los que las sustituciones en las cadenas laterales estabilizan adicionalmente los peptoides, híbridos peptoide-péptido e híbridos peptoide-péptido cíclicos. Se proporcionan en la Tabla 2 ejemplos no limitativos de diversas sustituciones que podrían utilizarse en la presente invención.

40 La producción de linfocitos infiltrantes de tumores (LIT) es un procedimiento de 2 etapas: 1) la etapa pre-ER (expansión rápida), en la que se cultivan las células en medio de laboratorio estándar, tal como RPMI, y se tratan las LIT con reactivos, tales como células nodriza irradiadas y anticuerpos anti-CD3 para conseguir el efecto deseado, y 2) el estado ER, en el que se expanden las LIT en una cantidad de cultivo suficientemente grande para tratar los pacientes. La etapa ER requiere reactivos de grado GMPc y 30 a 40 l de medio de cultivo. Sin embargo, la etapa pre-ER puede utilizar reactivos de grado de laboratorio (bajo la premisa de que los reactivos de grado de laboratorio resultan diluidos durante la etapa ER), facilitando la incorporación de estrategias alternativas para mejorar la producción de LIT. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el agonista de TLR y/o péptido o peptidomimético dado a conocer puede incluir en el medio de cultivo durante la etapa pre-ER.

50 La TCA puede llevarse a cabo mediante: (i) obtención de linfocitos autólogos a partir de un mamífero, (ii) cultivo de los linfocitos autólogos para producir linfocitos expandidos, y (iii) administración de los linfocitos expandidos en el mamífero. Preferentemente, los linfocitos se derivan de un tumor, es decir, son LIT, y se aíslan del mamífero que debe tratarse, es decir, transferencia autóloga.

55 La TCA autóloga tal como se describe en la presente memoria también puede llevarse a cabo: (i) cultivando linfocitos autólogos para producir linfocitos expandidos, (ii) administrando quimioterapia linforreductora no mieloablativa en el mamífero, y (iii) después de la administración de quimioterapia linforreductora no mieloablativa, administrando los linfocitos expandidos en el mamífero. Los LIT autólogos pueden obtenerse del estroma de tumores resecados. Se obtienen muestras de tumor de los pacientes y se obtiene una suspensión de células individuales. La suspensión de células individuales puede obtenerse de cualquier manera adecuada, p.ej., mecánicamente (desagregando el tumor utilizando, p.ej., un disociador gentleMACS(TM), Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.) o enzimáticamente (p.ej., colagenasa o ADNasa).

65 La expansión de linfocitos, incluyendo linfocitos infiltrantes de tumor, tales como células T, puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, las células T pueden expandirse

rápidamente utilizando la estimulación no específica de receptores de células T en presencia de linfocitos nodriza e interleuquina-2 (IL-2), IL-7, IL-15, IL-21 o combinaciones de las mismas. El estímulo no específico de receptor de células T puede incluir, p.ej., aproximadamente 30 ng/ml de OKT3, un anticuerpo monoclonal anti-CD3 de ratón (disponible de Ortho-McNeil(R), Raritan, N.J., o Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Alternativamente, las células T pueden expandirse rápidamente mediante estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) in vitro con uno o más antígenos

(Incluyendo partes antigénicas de los mismos, tales como uno o más epítomos, o una célula del cáncer, que puede expresarse opcionalmente a partir de un vector, tal como un péptido de unión a antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2), p.ej., aproximadamente 0,3 μ M MART-1: 26-35 (27 L) o gp100:209-217 (210M)), en presencia de un factor de crecimiento de células T, tal como aproximadamente 200-400 IU/ml, tal como 300 IU/ml de IL-2 o IL-15, resultando preferente IL-2. Las células T inducidas in vitro se expanden rápidamente mediante reestimulación con el mismo antígeno o antígenos del cáncer pulsado en células presentadoras de antígeno expresantes de HLA-A2. Alternativamente, las células T pueden reestimularse con linfocitos autólogos irradiados o con linfocitos alogénicos HLA-A2+ irradiados e IL-2, por ejemplo.

El propósito de la linforreducción es hacer sitio para los linfocitos infundidos, en particular mediante la eliminación de células T reguladoras y otras células T no específicas que compiten para las citoquinas homeostáticas. La quimioterapia linforreductora no mieloablativa puede ser cualquier terapia de este tipo adecuada, que puede administrarse mediante cualquier vía adecuada conocida por el experto en la materia. La quimioterapia linforreductora no mieloablativa puede comprender, por ejemplo, la administración de ciclofosfamida y fludarabina, particularmente si el cáncer es melanoma, que puede ser metastásico. Una vía preferente de administración de ciclofosfamida y fludarabina es la vía intravenosa. De manera similar, puede administrarse cualquier dosis adecuada de ciclofosfamida y fludarabina. Preferentemente, se administran aproximadamente 40 a 80 mg/kg, tal como aproximadamente 60 mg/kg, de ciclofosfamida durante aproximadamente dos días, seguido de la administración de aproximadamente 15 a 35 mg/m², tal como aproximadamente 25 mg/m² de fludarabina durante aproximadamente cinco días, particularmente si el cáncer es melanoma. La reactividad tumoral específica de los LIT expandidos puede someterse a ensayo mediante cualquier método conocido de la técnica, p.ej., mediante la medición de la liberación de citoquinas (p.ej., interferón-gamma) seguido del cocultivo con células tumorales. En una realización, el método de TCA autólogo comprende enriquecer los LIT en cultivo en células T CD8⁺ antes de la rápida expansión de las células. Tras el cultivo de los LIT en IL-2, las células T se empobrecen en células CD4⁺ y se enriquecen en células CD8⁺ utilizando, por ejemplo, una separación con microperlas CD8 (p.ej., utilizando un sistema de microperlas CD8 CiniMACS<plus> (Miltenyi Biotec)). En una realización del método, un factor de crecimiento de células T que estimula el crecimiento y activación de las células T autólogas se administra en el mamífero concomitantemente con las células T autólogas o después de las células T autólogas. El factor de crecimiento de células T puede ser cualquier factor de crecimiento adecuado que estimule el crecimiento y activación de las células T autólogas. Entre los ejemplos de factores de crecimiento de células T adecuados se incluyen interleuquina (IL)-2, IL-7, IL-15, IL-12 e IL-21, que pueden utilizarse solos o en diversas combinaciones, tales como IL-2 e IL-7, IL-2 e IL-15, IL-7 e IL-15, IL-2, IL-7 e IL-15, IL-12 e IL-7, IL-12 e IL-15, o IL-12 e IL2. IL-2 es un factor de crecimiento de células T preferente.

Preferentemente, los linfocitos expandidos producidos mediante dichos métodos se administran como infusión intraarterial o intravenosa, que preferentemente dura aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos. Entre otros ejemplos de vías de administración se incluyen la intraperitoneal, intratecal e intralinfática. De manera similar, puede administrarse cualquier dosis adecuada de linfocitos. En una realización, se administran aproximadamente 1×10^{10} linfocitos a aproximadamente 15×10^{10} linfocitos.

El cáncer tratado mediante las composiciones y métodos dados a conocer puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer óseo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal o anorrecto, cáncer de ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal u oído medio, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer cervical, glioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer renal, cáncer laríngeo, cáncer hepático, cáncer pulmonar, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no de Hodgkin, cáncer ovárico, peritoneo, omento y cáncer de mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de tejidos blandos, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de uréter, cáncer de vejiga urinaria y cáncer de tracto digestivo, tal como, p.ej., cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de la cavidad oral, cáncer colorrectal y cáncer hepatobiliar.

El cáncer puede ser un cáncer recurrente. Preferentemente, el cáncer es un cáncer sólido- Preferentemente, el cáncer es melanoma, cáncer ovárico, de mama y colorrectal, todavía más preferentemente es melanoma, en particular melanoma metastásico.

Definiciones

El término “sujeto” se refiere a cualquier individuo que es la diana de administración o tratamiento. El sujeto puede ser un vertebrado, por ejemplo un mamífero. De esta manera, el sujeto puede ser un paciente humano o veterinario. El término “paciente” se refiere a un sujeto bajo tratamiento de un profesional sanitario, p.ej., un médico.

La expresión “terapéuticamente eficaz” se refiere a que la cantidad de la composición utilizada es una cantidad suficiente para mejorar una o más causas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Dicha mejora sólo requiere una reducción o alteración, no necesariamente la eliminación.

El término “tratamiento” se refiere a la gestión médica de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, condición patológica o trastorno. El término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, condición patológica o trastorno, e incluye además el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, condición patológica o trastorno asociado. Además, dicho término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas y no para la curación de la enfermedad, condición patológica o trastorno; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, condición patológica o trastorno asociado, y el tratamiento de soporte, es decir, el tratamiento utilizado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, condición patológica o trastorno asociado.

Los términos “péptido”, “proteína” y “polipéptido” se utilizan intercambiamente para referirse a una molécula natural o sintética que comprende dos o más aminoácidos unidos mediante el grupo carboxilo de un aminoácido al grupo alfa-amino de otro.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “peptidomimético” se refiere a un mimético de un péptido que incluye alguna alteración de la química del péptido normal. Los peptidomiméticos típicamente potencial alguna propiedad del péptido original, tal como una estabilidad incrementada, eficacia incrementada, administración potenciada, semivida incrementada, etc. Los métodos de preparación de peptidomiméticos basados en una secuencia de polipéptido conocida se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 5.631.280, nº 5.612.895 y nº 5.579.250. La utilización de peptidomiméticos puede implicar la incorporación de un residuo no aminoácido con enlaces no amida en una posición dada. Una realización de la presente invención es un peptidomimético en el que el compuesto presenta un enlace, un esqueleto peptídico un componente aminoácido sustituido por un mimético adecuado. Entre algunos ejemplos no limitativos de aminoácidos no naturales que pueden resultar miméticos de aminoácidos adecuados se incluyen β -alanina, ácido L- α -amino butírico, ácido L- γ -amino butírico, ácido L- α -amino isobutírico, ácido L- ϵ -amino caproico, ácido 7-amino heptanoico, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, N- ϵ -Boc-N- α -CBZ-L-lisina, N- ϵ -Boc-N- α -Fmoc-L-lisina, L-metionina sulfona, L-norleucina, L-norvalina, N- α -Boc-N- δ CBZ-L-ornitina, N- δ -Boc-N- α -CBZ-L-ornitina, Boc-p-nitro-L-fenilalanina, Boc-hidroxi prolina y Boc-L-tioprolina.

El término “peptide” se refiere a una clase de peptidomiméticos las cadenas laterales de los cuales están unidas al átomo de nitrógeno del esqueleto peptídico y no a los carbonos α (como ocurre en los aminoácidos).

La expresión “linfocito infiltrante de tumor” o “Lit” se refiere a glóbulos blancos que han dejado el torrente sanguíneo y han migrado al interior de un tumor.

El término “regresión” no implica necesariamente una regresión de 100% o regresión completa. Por el contrario, existen grados variables de regresión que el experto ordinario en la materia reconocerá como un beneficio potencial o efecto terapéutico. El término comprende además retrasar la aparición de la enfermedad, o un síntoma o condición de la misma.

El término “grapa” o “grapa de hidrocarburo” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la utilización de un hidrocarburo para estabilizar la estructura secundaria de un péptido sintético o peptidomimético.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: utilización de TLR como diana para mejorar la expansión y actividad de los LIT

Los receptores de tipo Toll (TLR) son receptores de reconocimiento de patrones que reconocen una amplia diversidad de moléculas microbianas. La unión de los ligandos de TLR a los TLR expresados sobre macrófagos y células dendríticas (CD) conduce a una presentación de antígeno eficaz para la activación de las células T y la inmunidad del huésped. En el medio tumoral, la función de los macrófagos y las CD se encuentra inhibida. Tal como se da a conocer en la presente memoria, dicho estado suprimido puede revertirse mediante la administración de ligandos de TLR (Tabla 1). Los ligandos de TLR exógenos añadidos a los cultivos de LIT pueden mejorar la función de las CD y macrófagos, resultando en una expansión incrementada de los LIT y respuestas inmunitarias específicamente tumorales mejoradas.

Tabla 1. Receptores y ligandos de TLR

| Ligandos de | Receptores | Tipos celulares |
|-------------|------------|---|
| TLR 1 | Pam3CSK4 | monocitos/macrófagos un subgrupo de células dendríticas |
| TLR 2 | Pam3CSK4 | monocitos/macrófagos células dendríticas mieloides |
| TLR 3 | poli I:C | células dendríticas |
| TLR 4 | Ribomunyl | monocitos/macrófagos células dendríticas mieloides |
| TLR 9 | CpG ODN | monocitos/macrófagos células dendríticas plasmacitoides |

Con el fin de determinar si los ligandos de TLR exógenos añadidos a los cultivos de LIT eran capaces de incrementar la expansión de los LIT y mejorar la especificidad tumoral, se trituraron tumores de melanoma frescos en fragmentos de 1 a 2 mm² en suplemento de medio con 6000 UI/ml de IL-2. Se cultivaron doce fragmentos en IL-2 solo. Se trataron grupos adicionales de 12 fragmentos con los ligandos de TLR siguientes: ligando de TLR1/2 Pam3CSK4 (1 µg/ml), ligando de TLR3 poli (I:C) (12,5 µg/ml), ligando de TLR4 Ribomunyl, un extracto bacteriano de grado clínico (1 µg/ml), ligando de TLR9 CpG ODN2006 (10 µg/ml). Se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco cada 2-3 días. Los LIT se dividieron en nuevos pocillos tras alcanzar la confluencia. Tras 10, 20 y 30 días de cultivo, se registró el número total de fragmentos tumorales que resultaban en crecimiento de los LIT. Además, se recogieron células de cada fragmento y se contaron. Se compararon los números de células entre el grupo de control de IL-2 y el grupo tratado con ligando de TLR. Se cocultivaron grupos de LIT individuales de cada fragmento con células de melanoma autólogas o de HLA compatible o no compatible, durante 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes celulares y se midió el IFN-gamma mediante ELISA estándar. El propósito de estos experimentos es determinar si la adición de ligandos de TLR resulta en un crecimiento incrementado de LIT a partir de los fragmentos, una proliferación incrementada de LIT y/o una activación específica tumoral incrementada de LIT.

Ejemplo 2: identificación de peptoides para la proliferación y activación de LIT

Además de los agonistas de TLR, los LIT pueden expresar otras moléculas coestimuladoras. Puede cribarse una biblioteca de peptoides a fin de identificar los compuestos que conducen a una proliferación y activación mejorada de los LIT. Se criba una biblioteca de peptoides que contiene aproximadamente 200.000 compuestos en un formato de tipo 384 pocillos. Las líneas celulares de LIT se marcan con puntos cuánticos rojos y se criban para identificar aquellos en la biblioteca que se unen selectivamente a las células rojas. Una vez se han identificado varios peptoides ligantes, se examina la proliferación de los LIT en presencia de los peptoides. Los peptoides que conducen a la proliferación de LIT (peptoides estimuladores) se examinan adicionalmente en un ensayo funcional.

Utilizando una línea de células T humanas (AS1), se miden los efectos de los peptoides estimuladores sobre la función de las células T. Las células AS1 son células T CD8⁺ humanas activadas que demuestran especificidad contra la línea celular 624 de melanoma, pero no la línea celular 888 de melanoma de HLA no compatible. Las células AS1 se cultivaron en 6000 UI/ml de IL-2 en presencia de dosis crecientes de peptoides estimuladores. Se contaron las células los días 3, 7, 10, 14 y 21 para determinar la dosis de peptoides estimuladores que conducía a una proliferación incrementada de células AS1. Con el fin de determinar si el cultivo con peptoides estimuladores conducía a una función potenciada de las células T, se midió el IFN-gamma, una citoquina secretada por las células T activadas. Las células AS1 se trataron con la dosis óptima de cuerpos peptoides estimuladores tal como se había determinado anteriormente. Entre los controles se incluyeron células AS1 solas y células AS1 tratadas con anticuerpo anti-41BB. Tras 7 días, se recogieron las células AS1 y se cocultivaron con células de melanoma 624. Como control negativo, se cocultivaron células AS1 con células de melanoma 888. Tras 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midió la producción de IFN-gamma mediante ELISA. Se realizaron comparaciones entre AS1 solo y AS1 tratado con peptoides estimuladores. A fin de explorar adicionalmente la eficacia de los peptoides estimuladores, se recogieron células T de los tumores de 10 pacientes con melanoma metastásico incluidos en ensayos clínicos aprobados por IRB en curso. Se cultivaron fragmentos de tumor en medio que contenía 6000 UI/ml de IL-2 para generar pools de células T tal como se ha indicado anteriormente (Pilon-Thomas S. et al., *J Immunother.* 35(8):615-20, 2012). Se añadieron peptoides irrelevantes o estimuladores a 12 fragmentos en cada condición. Los fragmentos tratados con isotipo IgG o anticuerpo anti-41bb (10 µg/ml) se utilizaron como controles. Tras 21 días, se recogieron las células T y se contaron. Para medir la activación, las células T se cocultivaron con células tumorales autólogas o de HLA compatible. Las células T solas y las células T cocultivadas con células tumorales de HLA no compatible se incluyeron como controles negativos. Las células T cultivadas en presencia de CD3/CD28 se incluyeron como control positivo. Tras 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midió la producción de IFN-gamma mediante ELISA. Además, se midió la proliferación de células T los días 7, 14 y 21 a fin de determinar si el cocultivo con peptoides estimuladores conducía a una proliferación incrementada de las células T infiltrantes de tumor. Estos estudios determinaron si el tratamiento de las células T con cuerpos peptoides anti-PDI mejoraba la proliferación y activación de las células T anti-melanoma.

Ejemplo 3: evaluación de la actividad de los LIT en un modelo murino

Una desventaja importante de los estudios de LIT es la incapacidad de someter a ensayo los LIT en un modelo in vivo. Se desarrolló un modelo murino para medir la eficacia de los LIT. Utilizando ratones NSG (ratones que no poseen células B y T, obtenidos de Jackson Laboratories), se implantaron en el flanco tumores de melanoma de paciente primario. Tras alcanzar el tumor 5 mm de diámetro, se transfirieron 1×10^7 LIT expandidas desde muestras de pacientes compatibles. Se midió el crecimiento tumoral y la supervivencia. Utilizando este modelo, se examinó si los LIT cultivados en medio IL-2 estándar, con ligandos de TLR o con peptoides estimuladores, conducía a un mejor rechazo tumoral in vivo.

Ejemplo 4: escaneo posicional con 69 sustituyentes diferentes

En algunas realizaciones, se preparó una biblioteca molecular que expresaba una mezcla de 69 compuestos definidos por la estructura general en la figura 4A, que presentaban diversos sustituyentes (listados en la Tabla 2), en las posiciones R₁, R₂ o R₃, en la que la totalidad de las posiciones restantes, R₁ y R₂, o R₁ y R₃ o R₂ y R₃, mostraba cada una de las posibles 69x69 combinaciones. Ello representa 69 x 69 x 3, es decir, 14.283 puntos diferentes. Este número

es mucho menos que todas las posibles combinaciones, 69 x 69 x 69, es decir, 328.509 puntos, que habría requerido 952,2 placas con 345 puntos en cada una. El enfoque de escaneo posicional sólo requiere 41,4 placas.

- 5 En la presente realización del enfoque de escaneo posicional, sólo se expresa en cada punto aproximadamente 1/69 de una sustancia pura. En el caso de que un cribado encuentre un positivo, se prepara nuevamente el positivo a fin de verificar su actividad. Este enfoque proporciona ~1,4% de una secuencia particular representada por pocillo y, mediante la comparación con positivos de otras placas que expresan discretamente las cadenas laterales en cada una de las tres cadenas laterales, pueden determinarse las cadenas laterales preferentes.

10

Tabla 2. Ejemplos de sustituyentes en las posiciones R₁, R₂ o R₃

| | |
|----|--|
| 1 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ |
| 2 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ |
| 3 | H ₂ N-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂ |
| 4 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH(CH ₃) ₂ |
| 5 | H ₂ N-CH ₂ -CICLOPENTILO |
| 6 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CICLOPENTILO |
| 7 | H ₂ N-CH ₂ -CYCLOHEXILO |
| 8 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CYCLOHEXILO |
| 9 | H ₂ N-CH ₂ -FENILO |
| 10 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -FENILO |
| 11 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -FENILO |
| 12 | H ₂ N-CH ₂ -(1-NAFTILO) |
| 13 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(1-NAFTILO) |
| 14 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -(1-NAFTILO) |
| 15 | H ₂ N-CH ₂ -(2-NAFTILO) |
| 16 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(2-NAFTILO) |
| 17 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -(2-NAFTILO) |
| 18 | H ₂ N-CH ₂ -(4-HIDROXIFENIL)-(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 19 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(4-HIDROXIFENIL)-(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 20 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -(4-HIDROXIFENIL)-(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 21 | H ₂ N-CH ₂ -(4-METOXIFENILO) |
| 22 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(4-METOXIFENILO) |
| 23 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -(4-METOXIFENILO) |
| 24 | H ₂ N-CH ₂ -(4-CLOROFENILO) |
| 25 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(4-CLOROFENILO) |
| 26 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -(4-CLOROFENILO) |
| 27 | H ₂ N-CH ₂ -(3-HIDROXIFENIL)-(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 28 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(3-HIDROXIFENIL)-(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 29 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -(3-HIDROXIFENIL)-(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 30 | H ₂ N-CH ₂ -(3-METOXIFENILO) |
| 31 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(3-METOXIFENILO) |
| 32 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -(3-METOXIFENILO) |
| 33 | H ₂ N-CH ₂ -(3-CLOROFENILO) |
| 34 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(3-CLOROFENILO) |
| 35 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -(3-CLOROFENILO) |
| 36 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -OCH ₃ |
| 37 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OCH ₃ |
| 38 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -OH(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 39 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 40 | H ₂ N-CH ₂ -(3-OXETANO) |
| 41 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(3-OXETANO) |
| 42 | H ₂ N-CH ₂ -4-PIRANO |
| 43 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(4-PIRANO) |
| 44 | H ₂ N-CH ₂ -COOH(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 45 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -COOH(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 46 | H ₂ N-CH ₂ -PHENYL-4-COOH(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 47 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -FENIL-4-COOH(PROTEGIDO CON TERC-BUTILO) |
| 48 | H ₂ N-CH ₂ -CO-NHCH ₃ (PROTEGIDO) |
| 49 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CO-NHCH ₃ |
| 50 | H ₂ N-CH ₂ -FENIL-4-CO-NHCH ₃ |
| 51 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -FENIL-4-CO-NHCH ₃ |
| 52 | H ₂ N-CH ₂ -CO-N(CH ₃) ₂ |

| | |
|----|--|
| 53 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CO-N(CH ₃) ₂ |
| 54 | H ₂ N-CH ₂ -FENIL-4-CO-N(CH ₃) ₂ |
| 55 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -FENIL-4-CO-N(CH ₃) ₂ |
| 56 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ (PROTEGIDO CON BOC) |
| 57 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ (PROTEGIDO CON BOC) |
| 58 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -NH-COCH ₃ |
| 59 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH-COCH ₃ |
| 60 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -MORFOLINA |
| 61 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -MORFOLINA |
| 62 | H ₂ N-CH ₂ -2-IMIDAZOL(PROTEGIDO CON BOC) |
| 63 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -2-IMIDAZOL(PROTEGIDO CON BOC) |
| 64 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -2-IMIDAZOL(PROTEGIDO CON BOC) |
| 65 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -N=C(NH ₂) ₂ (PROTEGIDO CON BOC) |
| 66 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -N=C(NH ₂) ₂ (PROTEGIDO CON BOC) |
| 67 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -N=C(NH ₂) ₂ (PROTEGIDO CON BOC) |
| 68 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -N=C(NH ₂) ₂ (PROTEGIDO CON BOC) |
| 69 | H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -(3-INDOLILO) |

La figura 5 es un ejemplo de una placa utilizada para el escaneo posicional. Los puntos 1 a 69 presentarían un R₁ idéntico en todos los puntos y cada una de las 69 cadenas laterales individuales y diferentes en R₂ y una mezcla de la totalidad de los 69 compuestos expresados en la posición R₃. Los puntos 70 a 138 análogamente presentaría la totalidad de las posiciones R₁ mostrando la cadena lateral 2 y cada una de las 69 cadenas laterales diferentes en la posición R₂ y una mezcla de 69 cadenas laterales diferentes en la posición R₃ y de esta manera sucesivamente para cubrir todas las posibles combinaciones. Las placas R₂ específicas presentarían una mezcla de 69 compuestos expresados en la posición R₁ y la totalidad de los 69 puntos con R₂ con la misma cadena lateral igual al compuesto 1 y cada uno de los 69 compuestos individuales para R₃ análogos a las placas específicas para R₁ indicadas anteriormente, las combinaciones restantes en las que la posición R₁ muestra cada una de las 69; la R₂ expresará la mezcla de los 69 compuestos y los puntos 1 a 69 presentará la misma cadena lateral en la posición R₃.

También se muestra en la figura 5 un ejemplo de los resultados del escaneo posicional. El primer punto sombreado presenta las mejoras cadenas laterales R₁ con la cadena lateral igual al compuesto 2 y R₂ es igual al compuesto 26, y por lo menos uno de los 69 compuestos posibles en la posición R₃. El punto siguiente muestra que el compuesto 3 es activo en R₁ y R₂ presenta el compuesto 10 y por lo menos uno de los 69 compuestos en la posición R₃. El último punto en la placa muestra que R₁ es igual al compuesto 5 y el compuesto 55 para R₂ y por lo menos uno de los 69 compuestos en la posición R₃. Mediante el análisis de los resultados de cribado análogos de las placas de posición R₂ y R₃, puede determinarse la secuencia exacta.

Se requieren 69 compuestos con reactividad similar en la reacción SN₂ para producir las aminas secundarias. Es posible una enorme variabilidad estructural, pero se muestran algunas cadenas laterales posibles en la Tabla 2.

Ejemplo 5: métodos de grapado para estabilizar el andamiaje de híbrido peptoide-péptido de tipo horquilla beta cíclica

Existen varios métodos de grapado viables que pueden utilizarse para estabilizar el andamiaje de híbrido peptoide-péptido de tipo horquilla beta cíclica. El grapado de dos cadenas laterales peptoides es lo más fácil de conseguir desde un punto de vista sintético y preorganizará dichas dos cadenas laterales peptoides para que se encuentren próximas entre sí y esa proximidad forzará conformaciones del andamiaje global que son compatibles con la estructura secundaria de tipo horquilla beta cíclica deseada. Las parejas más sencillas de grapar son las propargilaminas en las cadenas laterales peptoides que deben graparse y la reacción de dichos dos alquinos terminales con una diazida bifuncional con un conector orgánico estable que cruza la distancia entre dichas cadenas laterales peptoides. El conector orgánico requiere 3 átomos más para cruzar dicha distancia. El grupo metaxilenilo se muestra en la figura 6; sin embargo, puede utilizarse cualquier combinación estable de átomos. Además, no es necesario que la cadena sea simplemente un conector, ya que el grupo también podría utilizarse para optimizar las propiedades farmacocinéticas, por ejemplo.

Alternativamente, puede utilizarse el mismo conector o un conector diferente para grapar las cadenas laterales propargilo que están en cadenas laterales peptoides más próximas, tal como se muestra en la figura 7. Tal como se indica en la presente memoria, también resulta posible una cadena lateral de una cadena lateral de aminoácidos y una cadena lateral peptoide proximal, aunque no se muestran. En la figura 8 se muestra un esquema más genérico que utiliza una azida y un alquino. También puede utilizarse la reacción de MCA (metatesis de cierre de anillo), tal como se muestra mediante el ejemplo genérico en la figura 9.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto en la materia a la que se refiere la invención dada a conocer.

El experto en la materia reconocerá o podrá determinar, utilizando nada más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención indicadas en la presente memoria. Se pretende que dichos equivalentes estén comprendidos en las reivindicaciones a continuación.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la expansión in vivo de linfocitos infiltrantes de tumor para la terapia celular adoptiva (TCA) del cáncer, que comprende el cultivo de los linfocitos para producir linfocitos expandidos en un medio de cultivo que comprende un agonista de receptor de tipo Toll (TLR) en una cantidad eficaz para mejorar la especificidad tumoral de los linfocitos expandidos.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el agonista de TLR es un ligando para un TLR seleccionado del grupo que consiste en TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que el agonista de TLR es un ligando seleccionado del grupo que consiste en Pam3CSK4, poli I:C, Ribomunyl y Cpg ODN.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer es un tumor sólido.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer ovárico, cáncer de mama y cáncer colorrectal.
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cáncer es metastásico.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el cáncer es recurrente.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sujeto es un ser humano.

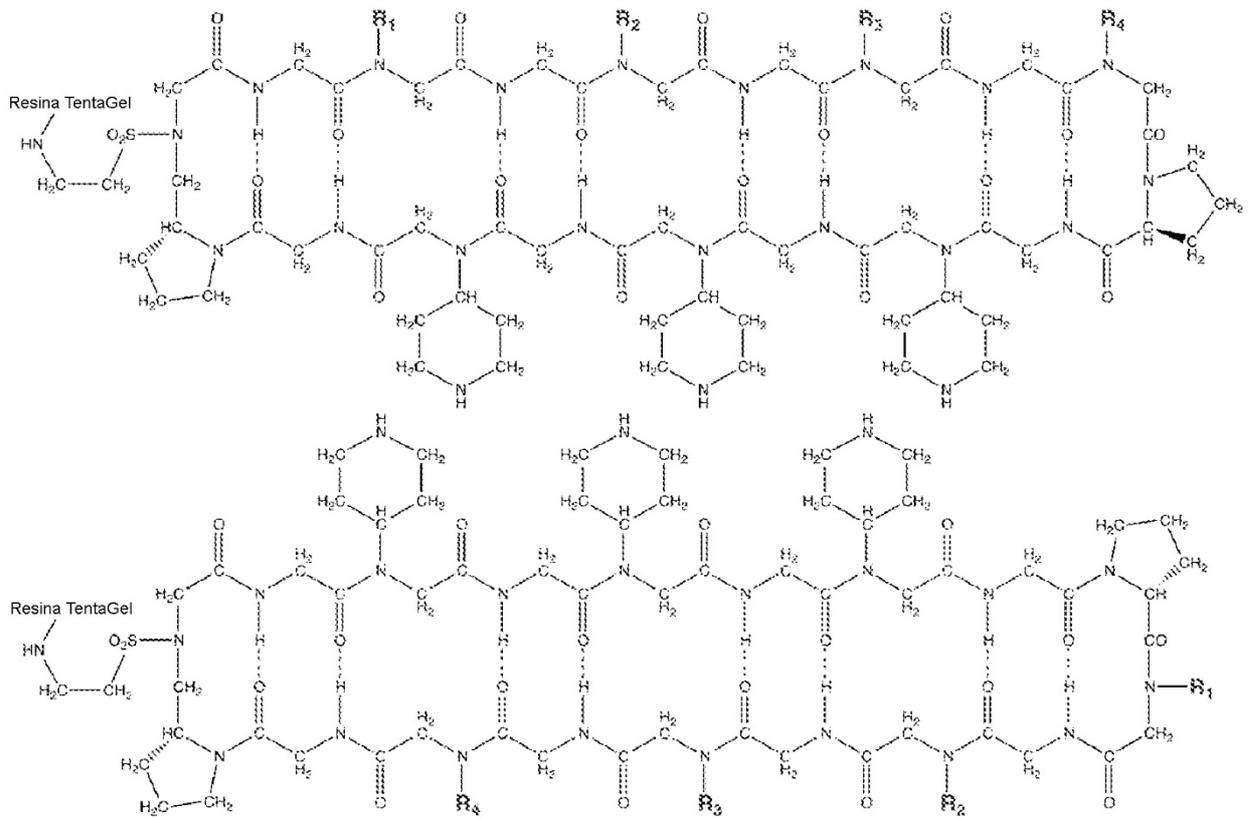


Figura 1A

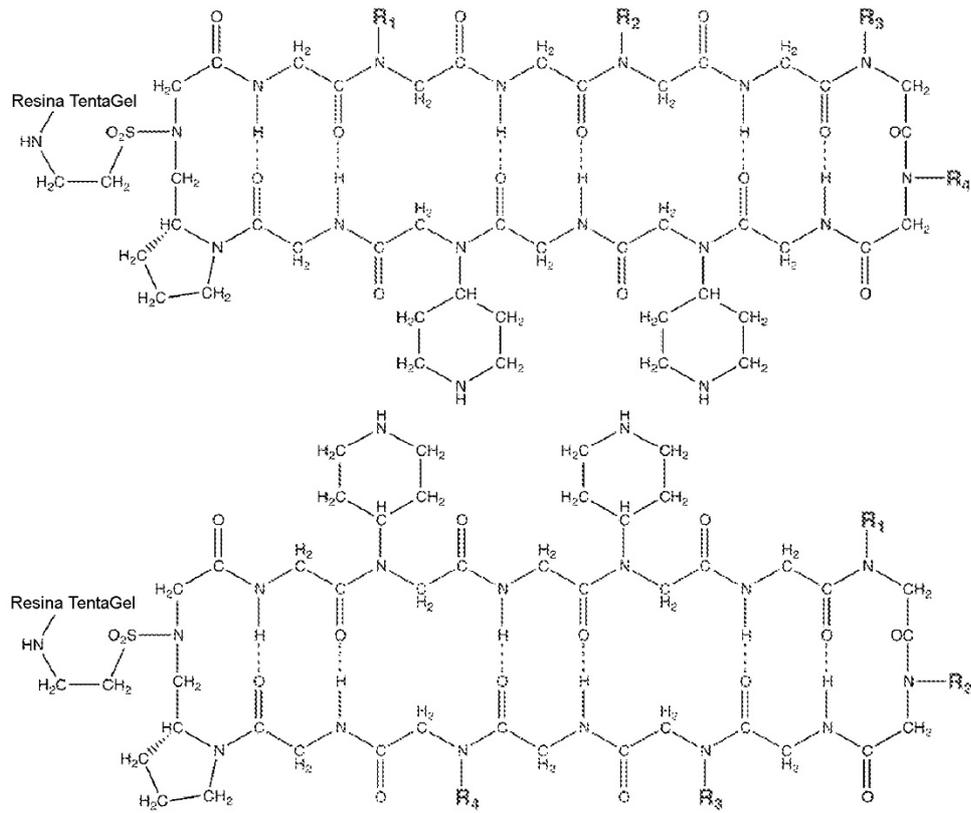


Figura 1B

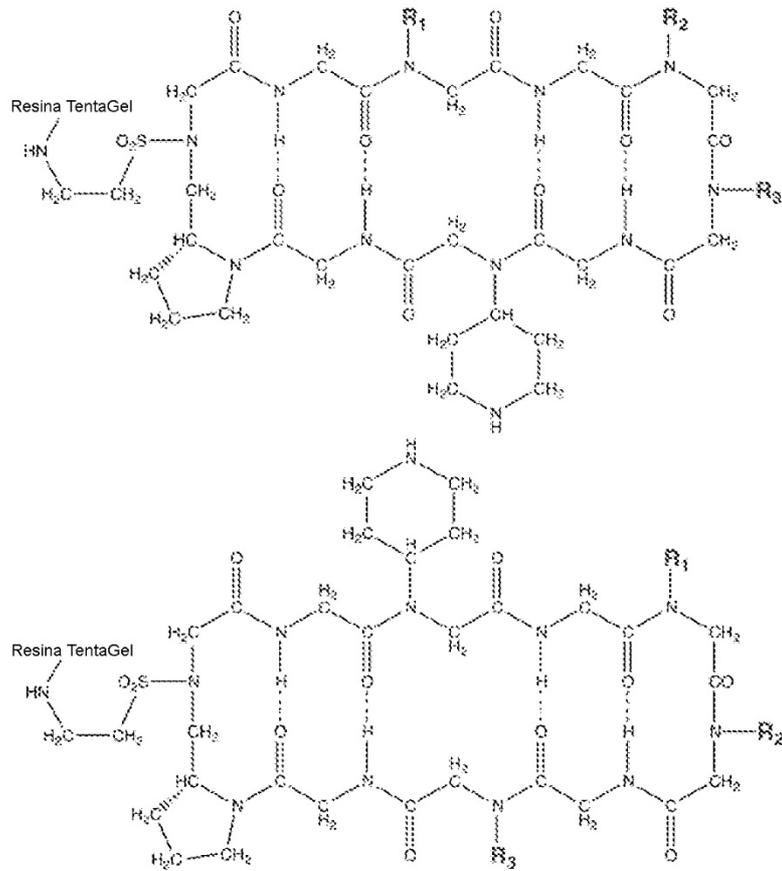
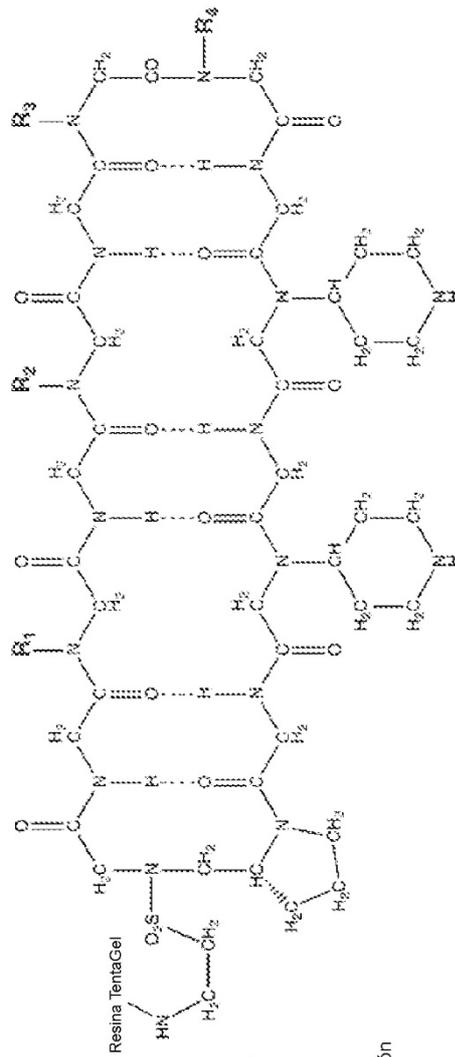


Figura 1C



- 1) Eliminar Fmoc, $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 2) $\text{H}_2\text{N-DMB}$, seguido de $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 3) $\text{H}_2\text{N-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHCbz}$,
then $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 4) $\text{H}_2\text{N-DMB}$, seguido de $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 5) $\text{H}_2\text{N-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHCbz}$,
then $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 6) $\text{H}_2\text{N-DMB}$, seguido de $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 7) $\text{H}_2\text{N-R}_4$, seguido de $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
-
- 8) $\text{H}_2\text{N-R}_3$, seguido de $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 9) $\text{H}_2\text{N-DMB}$, seguido de $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 10) $\text{H}_2\text{N-R}_2$, seguido de $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 11) $\text{H}_2\text{N-DMB}$, seguido de $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 12) $\text{H}_2\text{N-R}_1$, seguido de $(\text{BrCH}_2\text{CO})_2\text{O}$
 - 13) $\text{H}_2\text{N-DMB}$, seguido de TFA y ciclización
 - 14) HBr , AcOH
- DMB** = $\text{CH}_2(\text{2,4-dimetoxifenilo})$

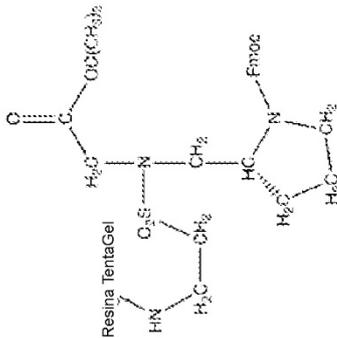


Figura 2

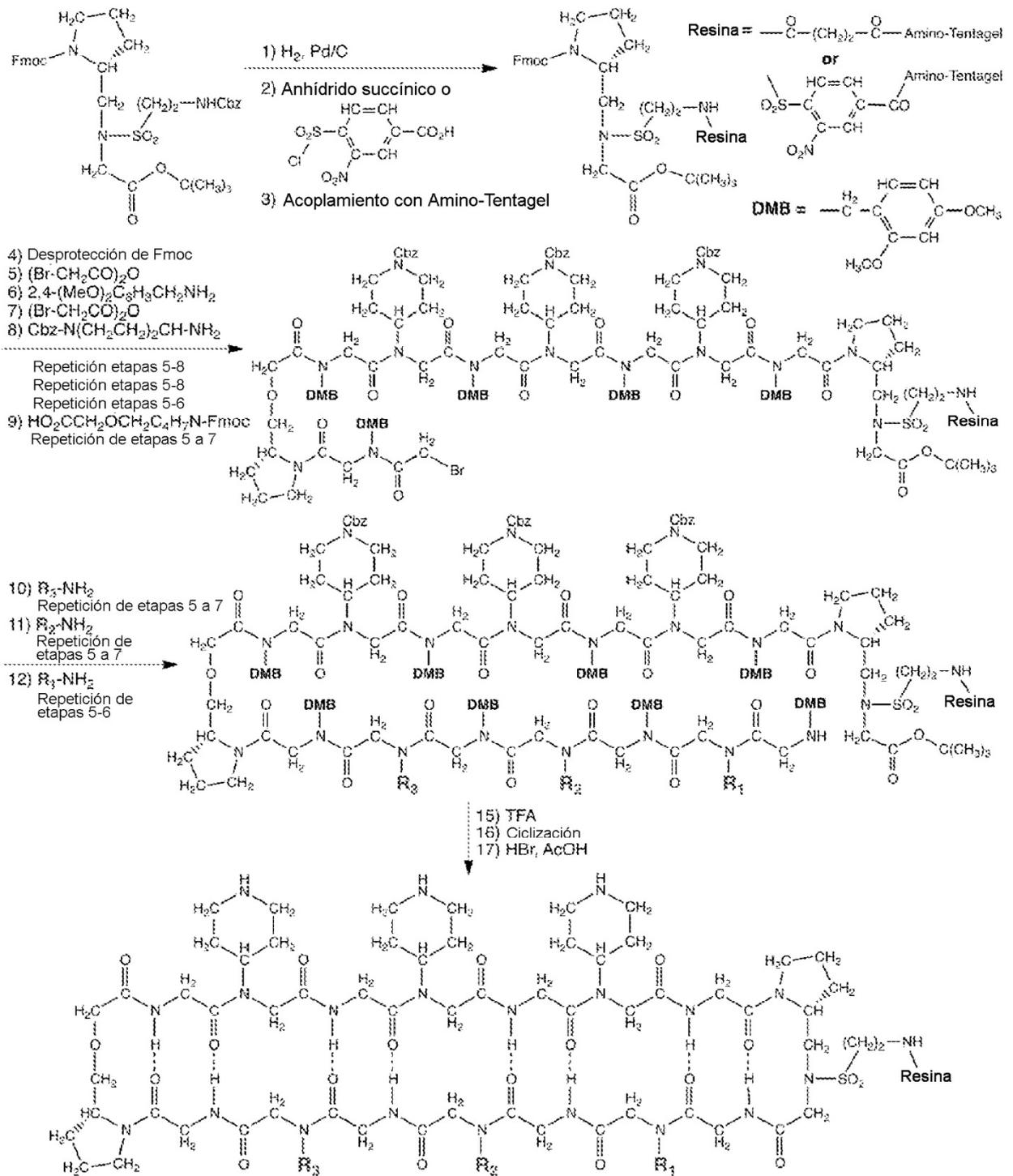


Figura 3

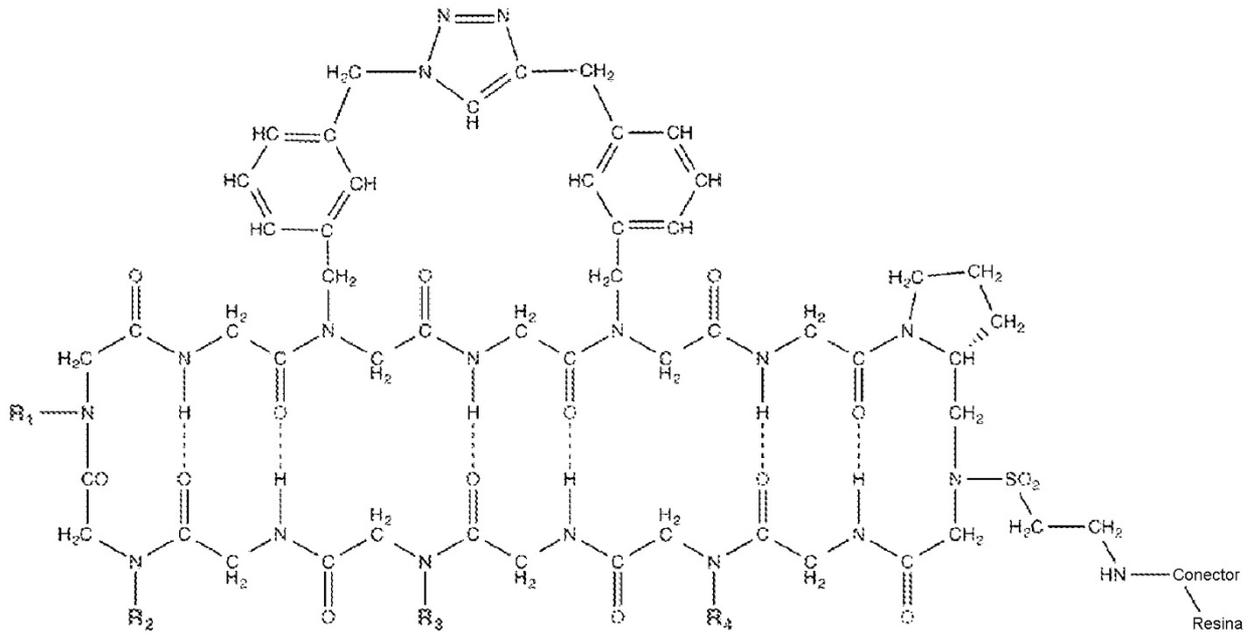


Figura 4A

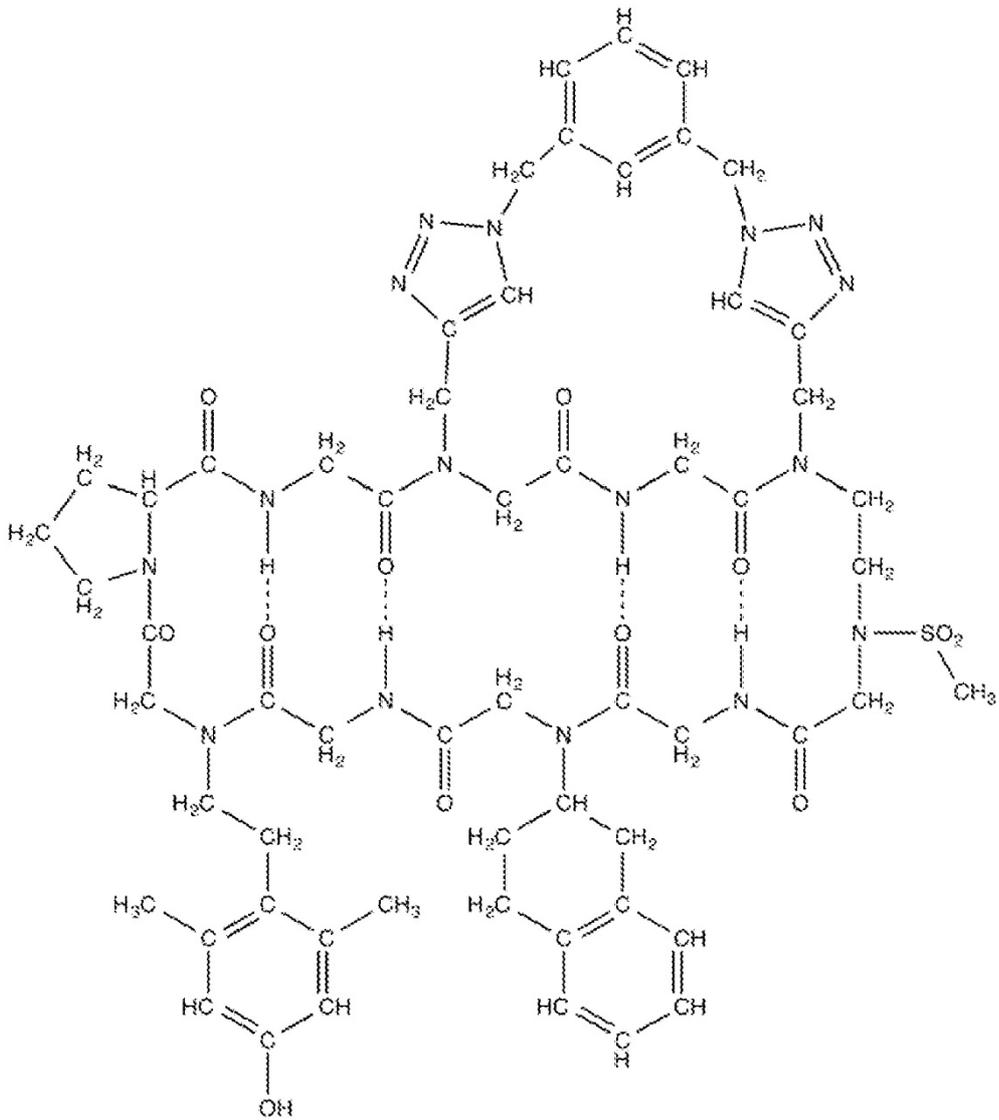


Figura 4B

orificios de 3 mm de diámetro con una oblea de polipropileno de 0,6 pulgadas de profundidad

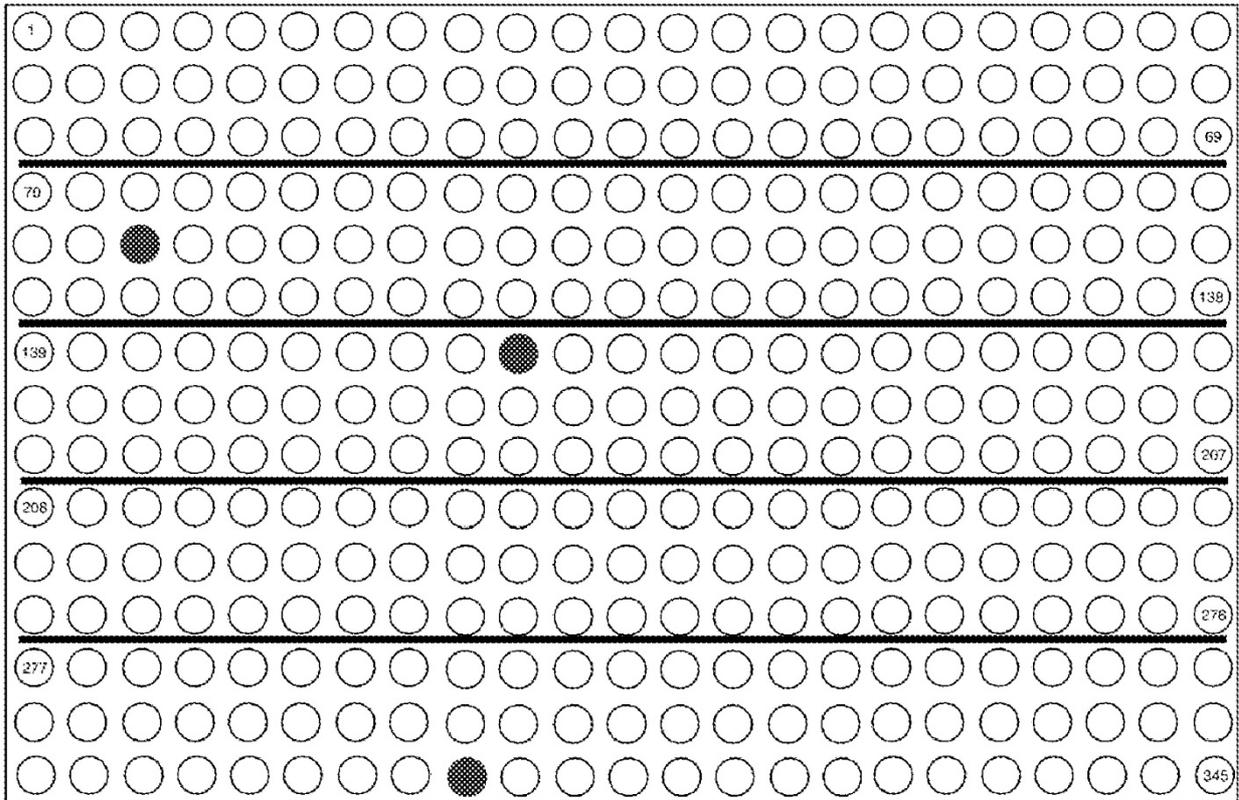


Figura 5

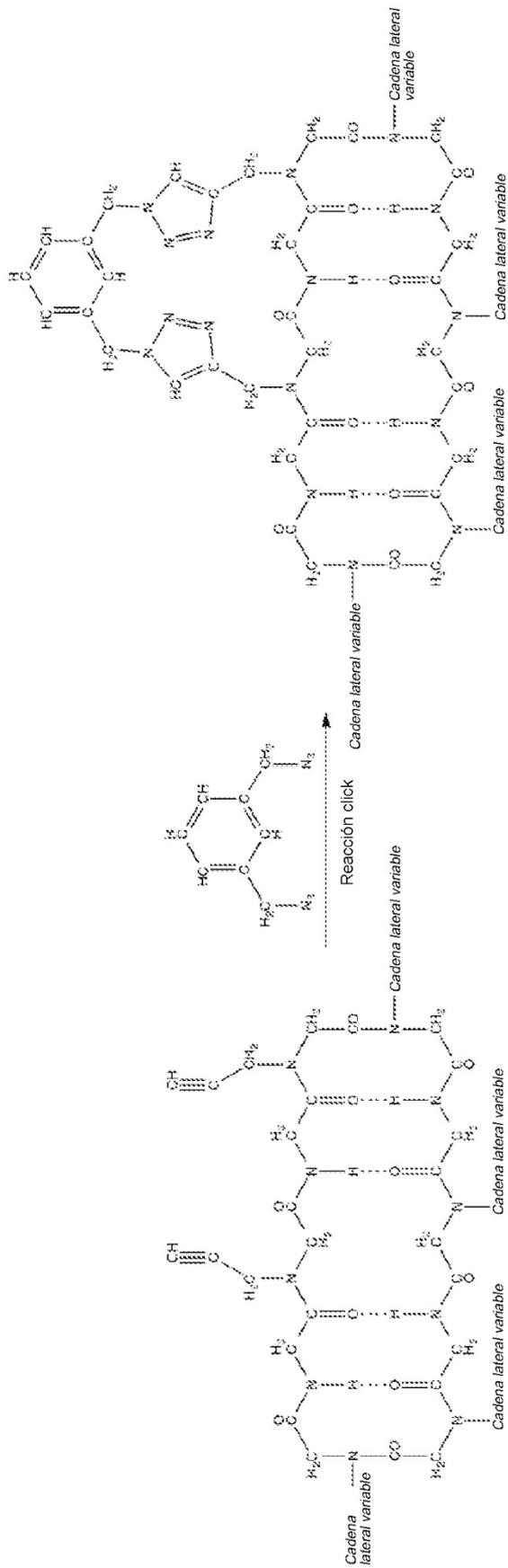


Figura 6

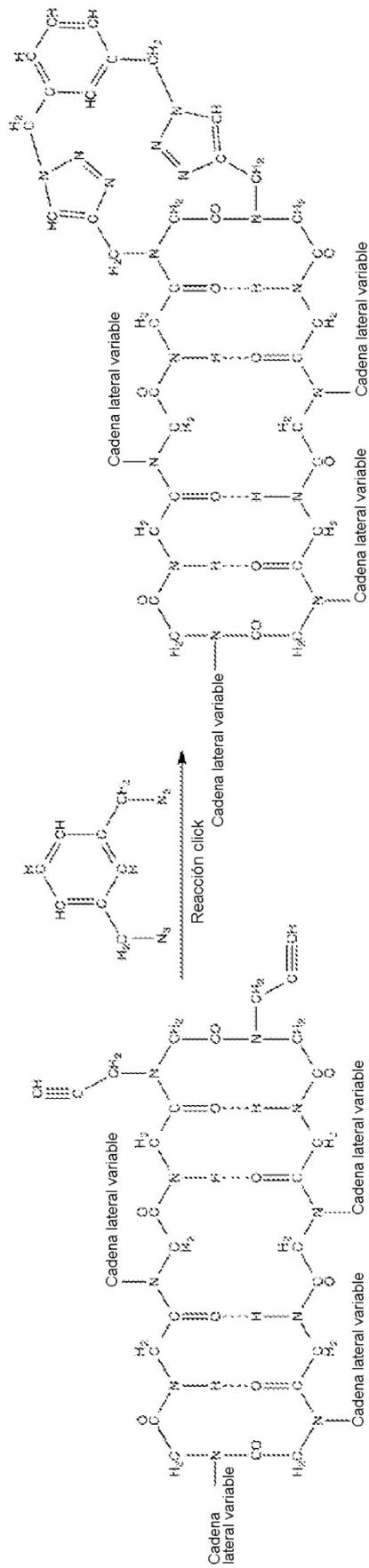


Figura 7

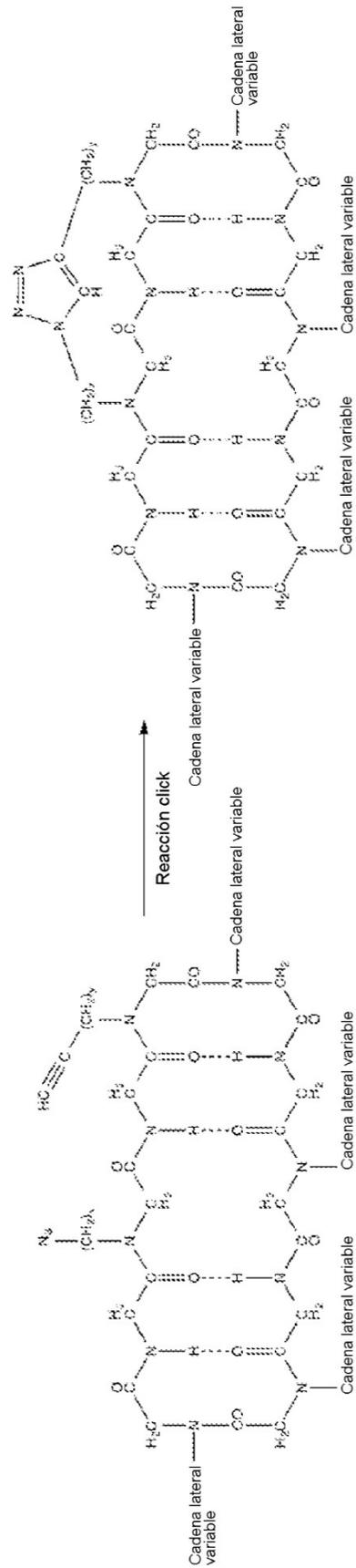


Figura 8

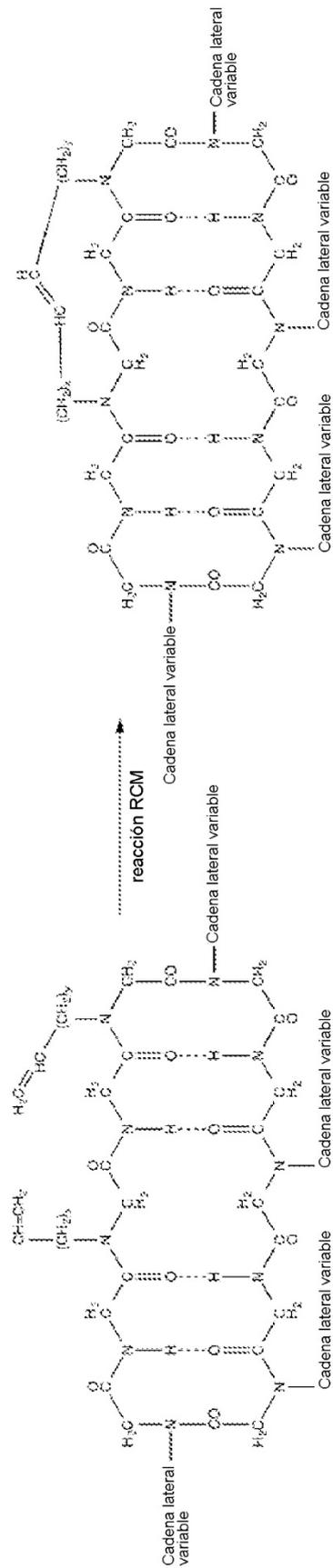


Figura 9