

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 023**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 17194467 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3326467**

54 Título: **Reconocimiento específico del microambiente tumoral mediante el uso de células NKT manipuladas**

30 Prioridad:

16.09.2011 US 201161535719 P

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

20.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 795 023 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

Reconocimiento específico del microambiente tumoral mediante el uso de células NKT manipuladas

5 Campo técnico

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

10 Antecedentes de la invención

10

Las células NKT invariantes V α 24 (NKT) son un sublinaje conservado evolutivamente de células T que se caracteriza por la expresión de una cadena α de TCR invariante, V α 24-J α 18 y reactividad a los glucolípidos derivados de microbios y autobios presentados por la molécula CD1d de clase HLA monomórfica-I (Kronenberg y Gapin, 2001). El potencial antitumoral de las NKT se ha demostrado en numerosos modelos tumorales (Swann y otros, 2004; Swann y otros, 2007; Berzofsky y Terabe, 2009). Se ha informado una disminución selectiva del número de células NKT y/o su actividad funcional en pacientes con diversos tipos de cáncer (Yanagisawa y otros, 2002; Tahir y otros, 2001; Dhodapkar y otros, 2003), lo que sugiere que las NKT pueden desempeñar un papel importante en las respuestas inmunitarias antitumorales y, por el contrario, que un escape de las NKT puede contribuir a la progresión del tumor. Las NKT se infiltran en tumores humanos primarios en un subconjunto de niños con neuroblastoma (NB) y esa infiltración de células NKT se asocia con una mejor supervivencia sin enfermedad a largo plazo (Metelitsa y otros, 2004). La infiltración de células NKT en tumores primarios también sirvió como factor pronóstico de resultado favorable en pacientes con cánceres colorrectales (Tachibana y otros, 2005) mientras que los bajos niveles de NKT circulantes predijeron un mal resultado clínico en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Molling y otros, 2007).

25

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

40

Los monocitos y otros precursores mielomonocíticos inmaduros de los TAM se localizan en el sitio del tumor en respuesta a CCL2, la misma quimiocina que atrae a las NKT (Metelitsa y otros, 2004). Sin embargo, las células monocíticas responden a múltiples señales quimiotácticas derivadas de otros tumores que no se reconocen por las NKT u otras células T (Allavena y otros, 2008). La mayoría de estos factores (VEGF, endotelina, angiopoyetina-2) se producen en condiciones hipóxicas y conducen la migración de los TAM a las áreas hipóxicas (Mantovani y otros, 2008; Allavena y otros, 2008; Mantovani y otros, 2006). De manera importante, la señalización hipóxica amplifica la activación de NF- κ B en los TAM que conduce a niveles altos de producción de IL6 y activación de STAT3 sostenida en las células tumorales que a su vez promueven respuestas inflamatorias en los TAM, lo que proporciona un circuito de retroalimentación positiva que desempeña un papel esencial en la progresión del tumor (Grivennikov y otros, 2010).

50

Aunque las NKT se localizan junto con los TAM productores de IL-6 en los tejidos primarios de NB (Song y otros, 2009), el mecanismo de esta colocalización no se comprende, ni está claro cómo los TAM evaden las actividades inhibitorias de las NKT. La comprensión de la interacción NKT-TAM en el contexto del microambiente tumoral es útil para el desarrollo de una inmunoterapia racional contra el cáncer que se dirige al estroma de soporte tumoral dado que las NKT son las únicas células efectoras inmunitarias que se conoce que reconocen específicamente y regulan negativamente los TAM. Como se describe en la presente descripción, la localización de las células NKT en NB depende no solo de CCL2 derivado de tumor, sino también de CCL20, que se produce por los TAM en respuesta a la inflamación e hipoxia inducidas por el tumor, que a su vez inhibe la viabilidad y función de las células NKT. Además, como se muestra en la presente descripción, la IL-15 protege a las NKT de la hipoxia y la expresión transgénica de IL-15 en las NKT aumenta fuertemente su eficacia antitumoral en un modelo de NB metastásico en ratones NOD/SCID/IL2rgamma (nulos) humanizados (hu-NSG).

60

Células T asesinas naturales invariantes V α 24 (NKT) en inmunidad tumoral e inmunoterapia. Como se señaló anteriormente, las NKT son un sublinaje conservado evolutivamente de células T que se caracteriza por la reactividad a los glucolípidos derivados de microbios y propios presentados por la molécula CD1d de clase HLA monomórfica-I. Expresan una cadena α de TCR invariante V α 14-J α 18 que se combina preferentemente con V β 11 (Porcelli y otros, 1993; Lantz y Bendelac, 1994; Bendelac y otros, 1995). Las NKT son linfocitos de vida larga que se desarrollan en el timo y están presentes incluso en los recién nacidos como células funcionales con fenotipo de memoria efectora (Baev y otros, 2004; Godfrey y otros, 2010). El primer ligando descubierto para las NKT fue la α -galactosilceramida (α GalCer, KRN7000),

65

que demostró propiedades antitumorales potentes en ratones (Swann y otros, 2007; Kronenberg y Gapin, 2002; Benedelac y otros, 2007). A pesar de que la mayoría de los tumores sólidos tanto en humanos como en ratones son negativos a CD1d, el potencial antitumoral de las NKT se ha demostrado en numerosos modelos de cáncer (Swann y otros, 2007) aunque los resultados de los ensayos clínicos de fase I/II aún no son concluyentes más allá de la demostración de seguridad (Nieda y otros, 2004; Ishikawa y otros, 2005; Chang y otros, 2005; Motohashi y otros, 2009; Kunii y otros, 2009). La infiltración de células NKT de tumores primarios se asoció con un buen resultado en niños con neuroblastomas (NB) (Metelitsa y otros, 2004), un hallazgo que desde entonces se ha extendido a otros tumores malignos (Dhodapkar, 2009; Tachibana y otros, 2005; Molling y otros, 2007). Las NKT se localizan conjuntamente con los macrófagos asociados a tumores (TAM) en los NB primarios y, tras reconocer los glucolípidos derivados de tumores, matan específicamente estas células de una manera dependiente de CD1d (Song y otros, 2009). Debido a que los TAM proporcionan un soporte estromal crítico para el crecimiento de células tumorales en muchos tipos de cáncer, la destrucción de los TAM mediada por células NKT explica cómo las NKT controlan indirectamente el crecimiento tumoral. Sin embargo, esto puede que no sea suficiente para la erradicación del tumor.

Inmunoterapia con CAR.GD2 + EBV-CTL. Las células T modificadas genéticamente para forzar la expresión de proteínas quiméricas que se conocen como receptores de antígeno quimérico (CAR) pueden proporcionar un medio para combinar las propiedades de reconocimiento específico de los anticuerpos con la biodistribución "activa" y la función efectora de las células T (Dotti y otros, 2009). Según las observaciones de que los CTL específicos para EBV (EBV-CTL), sobreviven más de 10 años después de la transferencia adoptiva (Pule y otros, 2008), existe un ensayo clínico realizado recientemente en el que los pacientes con NB recidivante/refractario recibieron EBV-CTL y células T autólogas (ATC), cada uno de los cuales expresa un CAR distinguible que se dirigió al antígeno GD2 expresado por los neuroblastos. Los resultados demostraron que los EBV-CTL modificados con CAR tenían una persistencia y citotoxicidad superiores en comparación con las ATC modificadas con CAR (Pule y otros, 2008; Louis y otros, 2011). La infusión de CAR.GD2+ CTLs fue segura y dio como resultado respuestas tumorales (que incluyen una remisión completa) en 4/8 de los pacientes con enfermedad refractaria/recidivante (Pule y otros, 2008). Algunos pacientes en este estudio también recibieron mAb anti-CD45 que agota los leucocitos como parte del condicionamiento. Una de las observaciones más llamativas fue que las respuestas tumorales en dos de esos pacientes que recibieron anti-CD45 se asociaron con una necrosis tumoral rápida y extensa, que fue desproporcionada con respecto al número de células T infiltrantes que se observaron en la biopsia. Esta observación clínica sugirió que el reconocimiento específico de las células de origen hematopoyético que soportan el tumor podría haber contribuido a la eficacia de la inmunoterapia con CAR.GD2+ CTL para el NB. Debido a que las NKT se localizan activamente en tumores NB y matan a los TAM mediante el uso de su especificidad TCR nativa, en las modalidades de la presente invención, la expresión de CAR.GD2 en las NKT terapéuticas les permite matar tanto a los TAM como a los neuroblastos que conducen a la erradicación del tumor.

La importancia de la coestimulación para la función de las células T y NKT. En los ensayos iniciales en humanos, los linfocitos T que expresan CAR de primera generación mostraron una expansión limitada y una persistencia relativamente corta (Pule y otros, 2008; Till y otros, 2008; Kershaw y otros, 2006). Es probable que este resultado refleje la falla de las moléculas CAR artificiales para activar completamente las células T después de la participación del antígeno en las células tumorales, especialmente cuando las células tumorales carecen de la expresión de las moléculas coestimuladoras (como CD80 y CD86) que se requieren para la activación, el crecimiento y la supervivencia sostenidos de las células T (Zou, 2005). Para proporcionar la falta de coestimulación en los objetivos de células tumorales y de esta manera superar las limitaciones anteriores, varios grupos han incorporado endodominios coestimuladores, que incluyen a CD28 y CD137 (Maher y otros, 2002; Porter y otros, 2011). En un ensayo clínico que se informó recientemente, a los pacientes con linfomas de células B se les infundieron simultáneamente 2 productos de células T autólogas que expresaban CAR con la misma especificidad para el antígeno CD19. Un CAR codificó tanto el coestimulador CD28 como el ζ -endodomain, mientras que el otro codificó solo el ζ -endodomain. Las células T CAR⁺ que contienen el endodominio CD28 mostraron una expansión y persistencia notablemente mejoradas en comparación con las células T CAR⁺ que carecen de este endodominio (Savoldo y otros, 2011). Otro ensayo clínico reciente de fase I/IIa mostró que las células T modificadas genéticamente para expresar dominios coestimuladores CD19 CAR con 4-1BB (CD137) indujeron remisiones persistentes en pacientes con leucemia linfocítica crónica resistente, incluso aquellos con enfermedad voluminosa (Porter y otros, 2011). Existe una evidencia creciente de que la coestimulación desempeña un papel crítico en la activación, expansión y supervivencia de las NKT. Varios informes demostraron que las vías B7:CD28, CD40:CD40L y OX40:OX40L son importantes para la expansión y posterior producción de citocinas sistémicas por las células NKT (Uldrich y otros, 2005). Las NKT también expresan OX40 y la administración intratumoral de DC modificadas para expresar la acumulación de células NKT dependientes de OX40 inducidas por OX40L y la producción de IFN-gamma en el sitio del tumor dio como resultado una supresión potente del crecimiento tumoral (Zaini y otros, 2007). CD137 no se expresa en las NKT inactivas, pero se indujo rápidamente tras la activación de TCR, y la estimulación de CD137 mediante una activación de las células NKT promovida por el mAb anti-4-1BB agonista que da como resultado una producción mejorada de citocinas por las células NKT en respuesta a aGalCer (Vinay y otros, 2004; Kim y otros, 2008). Por lo tanto, en las modalidades de la invención, la expresión de CAR con endodominios coestimuladores derivados de CD28, OX40 y/o CD137 (como ejemplos) proporciona una coestimulación óptima, que conduce a una eficacia antitumoral mejorada de las NKT modificadas con CAR.

El papel de la IL-15 en la homeostasis de las células NKT y la posible aplicación de la inmunoterapia contra el cáncer. El microambiente tumoral puede afectar la viabilidad y función de las células NKT, lo que sugiere que una estrategia inmunoterapéutica eficaz con NKT debe considerar sus requisitos homeostáticos. Los estudios en ratones han

demostrado que el desarrollo y el mantenimiento homeostático de células NKT dependen en gran medida de la IL-15 (Matsuda y otros, 2002). La IL-15 también estimula la proliferación y mejora la supervivencia de las NKT humanas (Baev y otros, 2004). Sin embargo, a diferencia del ratón, las NKT humanas negativas a CD4 (principalmente negativas doblemente a CD8/CD4, DN) expresan niveles mucho más altos de IL-2R β que el subconjunto positivo a CD4, de modo que la IL-15 expande preferentemente las NKT DN (Baev y otros, 2004). De manera importante, las NKT DN son más citotóxicas que las NKT positivas a CD4, y un informe reciente demostró que solo se requieren NKT DN para las respuestas antitumorales *in vivo* (Crowe y otros, 2005). La IL-15 protege a las NKT humanas de la hipoxia y la expresión transgénica de IL-15 en las NKT transferidas de forma adoptiva, mejora fuertemente su actividad antimetastásica en un modelo clínicamente relevante de NB en ratones NOD/SCID/IL-2Ry humanizado (nulo) (hu-NSG) (Liu y otros, 2012). Esto indica que la expresión de la IL-15 en las NKT para fines terapéuticos apoya la expansión, persistencia y actividad antitumoral de las NKT en pacientes con cáncer. En la presente invención, la coexpresión de la IL-15 mejora la persistencia y la actividad antitumoral de las NKT CAR.GD2 *in vivo*.

Expresión del gen suicida inducible Caspase-9 (iCasp-9) en células transgénicas. El uso de las NKT que expresan la IL-15 en la transferencia clínica adoptiva puede generar preocupaciones potenciales debido a la transformación leucémica que se informó en ratones transgénicos IL-15 (Fehniger y otros, 2001; Sato y otros, 2011) y en un clon de células T humanas (Hsu y otros, 2007). Aunque la transformación maligna de las células T modificadas genéticamente es un evento raro (Hsu y otros, 2007), uno puede incorporar un gen suicida que permita la eliminación de células transgénicas tras su activación farmacológica (Quintarelli y otros, 2007). La caspase-9 es un activador importante de regulación negativa de la apoptosis (Riedl y Salvesen, 2007), y el gen iCasp-9 se ha usado como gen suicida para la terapia con células T (Quintarelli y otros, 2007; Di y otros, 2011; Straathof y otros, 2005; Tey y otros, 2007). Brevemente, el ADNc de la caspasa-9 se fusiona en el marco con un dominio de unión a FK506 humano de 12 kDa (FKBP12) que contiene una mutación F36V, lo que permite la dimerización de la caspasa-9 y la activación de la vía apoptótica después de la exposición al análogo FK506 AP1903. Las células T que expresan la molécula iCasp-9 se eliminan eficientemente tras la activación farmacológica del gen suicida *in vitro* e *in vivo* (Quintarelli y otros, 2007; Tey y otros, 2007). Un ensayo clínico que se informó recientemente evaluó la actividad y la seguridad del sistema iCasp-9/AP1903 mediante la introducción del gen en las células T del donante administradas para mejorar la reconstitución inmunitaria en receptores de trasplantes de células madre haploidénticas. Una dosis única de fármaco dimerizante, administrada a cuatro pacientes en quienes se desarrolló la GVHD, eliminó las células T modificadas y terminó la GVHD sin recurrencia (Di y otros, 2011). Puede emplearse el mismo cambio de seguridad para controlar las NKT modificadas con genes en las modalidades de la invención.

La presente invención proporciona una solución para una necesidad sentida durante mucho tiempo en la técnica para asegurar métodos y composiciones que sean adecuados para dirigirse a las células cancerosas y a las células que soportan el ambiente de las células cancerosas.

Breve descripción de la invención

La presente descripción se dirige a métodos y composiciones asociadas con la terapia contra el cáncer, que incluye la terapia celular para el cáncer. En un aspecto, se proporciona una célula T asesina natural modificada genéticamente que comprende una construcción de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) con un dominio de señalización intracelular adecuado. Aunque el cáncer puede ser de cualquier tipo, en modalidades específicas el cáncer es neuroblastoma o melanoma. En modalidades particulares de la invención, se proporciona terapia celular para neuroblastoma. En modalidades específicas, la terapia celular comprende terapia celular con células T asesinas naturales (NKT). En modalidades particulares de la invención, está presente el reconocimiento específico por NKT de células en un microambiente tumoral, tal como macrófagos asociados a tumores (TAM). También se proporciona el reconocimiento específico por NKT de células tumorales directamente. En algunas modalidades, está presente el reconocimiento específico por NKT de los TAM y las células tumorales. En modalidades específicas, están presentes células NKT que albergan una o más construcciones de expresión que permiten que las células NKT modifiquen un microambiente tumoral y/o las células tumorales.

En modalidades particulares de la invención, están presentes células NKT que albergan un receptor de antígeno quimérico que se dirige a GD2 (ácido(2R,4R,5S,6S)-2-[3-[(2S,3S,4R,6S)-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-5-[(2S,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-2-[(2R,3S,4R,5R,6R)-4,5-dihidroxi-2-(hidroximetil)-6-[(E)-3-hidroxi-2-(octadecanoilamino)octadec-4-enoxi]oxan-3-il]oxi-3-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-4-il]oxi-3-amino-6-carboxi-4-hidroxioxan-2-il]-2,3-dihidroxipropoxi]-5-amino-4-hidroxi-6-(1,2,3-trihidroxipropil)oxano-2-carboxílico) expresado por las células cancerosas, y en modalidades específicas las células cancerosas son células de neuroblastoma; en aspectos específicos, dichas células NKT retienen la capacidad de matar los TAM y tienen especificidad por la TCR. En modalidades específicas, las células NKT pueden expresar adicionalmente la IL-15, la IL-2, la IL-4, la IL-7, o una combinación de estas, tal como a partir de una construcción de expresión en las células. En modalidades particulares, las células NKT comprenden un vector bi/tricistrónico que codifica a CAR.GD2, opcionalmente codifica a un endodominio coestimulador; que codifica a la IL-15; y que opcionalmente comprende un cambio suicida, tal como un cambio suicida inducible.

En algunas modalidades de la invención, existe una célula T asesina natural modificada genéticamente que comprende un ADNc seleccionado del grupo que consiste en un ADNc de IL-2, un ADNc de IL-4, un ADNc de IL-7, un ADNc de IL-15 o una mezcla de estos. En modalidades específicas, el ADNc es un ADNc de IL-2 o un ADNc de IL-15, incluso de seres humanos. En modalidades específicas, la célula abarca una construcción de expresión que comprende además un gen

suicida inducible, tal como un gen suicida inducible de la caspasa-9 o el gen suicida inducible es la timidina quinasa (sr39 TK). En una modalidad específica, la célula comprende además una etiqueta CD34.

5 También se proporciona un método para tratar un cáncer que comprende administrar una cantidad con eficacia terapéutica de células NKT de la invención a un sujeto que lo necesite. En los métodos, la célula NKT puede comprender un gen suicida inducible. En modalidades específicas del método, este comprende además la etapa de inducir la eliminación de la célula T asesina natural administrada mediante la activación del gen suicida inducible. En modalidades específicas, el gen suicida inducible es el gen suicida inducible de la caspasa-9. El método puede comprender además administrar AP20187, AP1903, o una mezcla de estos al sujeto para activar el gen suicida inducible de la caspasa-9. En algunos casos, el gen suicida inducible es la timidina quinasa (sr39 TK) y el método comprende además administrar ganciclovir al sujeto para activar la timidina quinasa.

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

20 En modalidades específicas, el cáncer a tratar se selecciona del grupo que consiste en neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de próstata, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia mieloide, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica, cáncer de tiroides, cáncer folicular de tiroides, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimatoso, fibrosarcoma, rhabdomyosarcomas, melanoma, melanoma uveal, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, tumor benigno de la piel, cáncer renal, linfoma anaplásico de células grandes, carcinoma esofágico de células escamosas, carcinoma hepatocelular, carcinoma folicular de células dendríticas, cáncer intestinal, cáncer muscular invasivo, tumor de la vesícula seminal, carcinoma epidérmico, cáncer de bazo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer cerebral, cáncer de la retina, cáncer biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer de glándulas salivales, cáncer de útero, cáncer de testículos, cáncer de tejido conectivo, hipertrofia prostática, mielodisplasia, macroglobinemia de Waldenstrom, cáncer nasofaríngeo neuroendocrino, síndrome mielodisplásico, mesotelioma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, carcinoide esofagogástrico, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer peritoneal, tumor seroso papilar tipo mulleriano, ascitis maligna, tumor estromal gastrointestinal (GIST) y un síndrome de cáncer hereditario seleccionado del síndrome de Li-Fraumeni y el síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL).

35 En métodos particulares de la invención, la célula T asesina natural se deriva de células del sujeto a tratar, aunque la célula puede provenir de otro individuo. En algunos casos de la invención, la administración de las células es sistémica, y la administración puede ser parenteral en algunos casos. En modalidades particulares, la célula T asesina natural se administra localmente al tumor. En algunas modalidades de los métodos, comprenden además administrar terapias adicionales contra el cáncer al sujeto.

40 El diagnóstico de neuroblastoma puede ocurrir por medios estándar, como la identificación de un bulto o masa inusual, por ejemplo en el abdomen del niño, lo que hace que se hinche. El diagnóstico también puede incluir uno o más de los análisis de catecolaminas en la sangre u orina, pruebas de imágenes, tomografías computarizadas, tomografías PET y/o biopsias, como la aspiración y la biopsia de médula ósea.

45 En algunas modalidades, existe una célula T asesina natural modificada genéticamente que comprende una construcción de expresión que codifica a la IL-2, la IL-4, la IL-7, la IL-15, o una combinación de estas. En modalidades específicas, la construcción codifica a la IL-2 o la IL-15. En ciertas modalidades, la construcción codifica a la IL-15, que incluye la IL-15 humana, por ejemplo. En casos particulares, la construcción de expresión comprende o es un vector, tal como un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral, un vector viral adenoasociado o un plásmido.

50 En algunas modalidades, la célula NKT comprende una construcción de expresión que codifica a un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se dirige a GD2. En modalidades específicas, el CAR comprende endodominios coestimuladores seleccionados del grupo que consiste en CD28, CD137, OX40, CD40, o una combinación de estos. En modalidades particulares, la construcción de expresión que codifica a la IL-2, la IL-4, la IL-7, la IL-15, o una combinación de estas y la construcción de expresión que codifica a un CAR que se dirige a GD2 son la misma construcción. En modalidades específicas, la expresión de la IL-2, la IL-4, la IL-7, la IL-15, o una combinación de estas y la expresión de CAR se regulan por la(s) misma(s) secuencia(s) reguladora(s). La construcción de expresión comprende un gen suicida inducible, en casos particulares, tal como un gen suicida inducible de la caspasa-9 o donde el gen suicida inducible es timidina quinasa (sr39 TK). En casos específicos, de la célula, la célula NKT comprende una etiqueta CD34.

60 La descripción proporciona un método para tratar un cáncer que comprende administrar una cantidad con eficacia terapéutica de una célula NKT modificada genéticamente a un sujeto que lo necesita. En modalidades específicas, la célula T asesina natural comprende un gen suicida inducible. En algunas modalidades, el método comprende además la etapa de inducir la eliminación de la célula T asesina natural administrada mediante la activación del gen suicida inducible. En algunos casos, el gen suicida inducible es el gen suicida inducible de la caspasa-9 y el método comprende además

administrar AP20187, AP1903, o una mezcla de estos al sujeto para activar el gen suicida inducible de la caspasa-9. En algunos casos, el gen suicida inducible es la timidina quinasa (sr39 TK) y el método comprende además administrar ganciclovir al sujeto para activar la timidina quinasa. En algunos casos de métodos de la invención, la célula NKT comprende una etiqueta CD34.

5 En algunos métodos de la invención, el cáncer es un tumor y, en aspectos particulares, el microambiente tumoral es hipóxico. En ciertos casos, el microambiente tumoral comprende menos del 15 % de O₂, menos del 10 % de O₂, menos del 5 % de O₂, menos del 4 % de O₂, menos del 3 % de O₂, menos del 2 % de O₂, o menos del 1 % de O₂. En modalidades específicas, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de próstata, tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia mielocítica, leucemia mielocítica aguda (AML), leucemia mielocítica crónica, cáncer de tiroides, cáncer folicular de tiroides, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimatoso, fibrosarcoma, rabdomiosarcomas, melanoma, melanoma uveal, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, tumor benigno de la piel, cáncer renal, linfoma anaplásico de células grandes, carcinoma esofágico de células escamosas, carcinoma hepatocelular, carcinoma folicular de células dendríticas, cáncer intestinal, cáncer muscular invasivo, tumor de la vesícula seminal, carcinoma epidérmico, cáncer de bazo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de la retina, cáncer biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de útero, cáncer de los testículos, cáncer de conectivo tejido, hipertrofia prostática, mielodisplasia, macroglobinemia de Waldenström, cáncer nasofaríngeo neuroendocrino, síndrome mielodisplásico, mesotelioma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, carcinoma esofagogástrico, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer peritoneal, tumor seroso papilar tipo mulleriano, ascitis maligna, tumor estromal gastrointestinal (GIST) y un síndrome de cáncer hereditario seleccionado del síndrome de Li-Fraumeni y el síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL). En modalidades particulares, el cáncer es un neuroblastoma. En algunos casos, la IL-15 es la IL-15 humana. Las células NKT pueden derivarse de células del sujeto o de otro individuo. La administración de las células puede ser sistémica o parenteral. En ciertos casos, la célula T asesina natural se administra localmente al tumor. En algunos casos, el método comprende además la administración de una o más terapias adicionales contra el cáncer a un sujeto.

30 Lo anterior destaca ampliamente las características y ventajas técnicas de la presente invención para que la descripción detallada de la invención que sigue pueda entenderse mejor. Se describirán particularidades adicionales y ventajas de la invención las cuales conforman el objeto de las reivindicaciones de la invención. Se debe apreciar para aquellos con experiencia en la materia que la concepción y las modalidades específicas descritas pueden utilizarse fácilmente como una base para modificar o diseñar otras estructuras para llevar a cabo los mismos propósitos de la presente invención. Resulta evidente además para aquellos con experiencia en la materia que tales construcciones equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones anexadas. Las características novedosas que se consideran características de la invención, tanto en cuanto a su organización como a su método de operación, junto con otros objetos y ventajas se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción. Se debe entender expresamente, sin embargo, que las descripciones se proporcionan con el propósito de ilustrar y describir solamente y no se pretenden como una definición de los límites de la invención.

Descripción de las figuras

45 Figura 1: El contacto con las células NB y la hipoxia inducen sinérgicamente CCL20 en monocitos humanos. (A) Los monocitos primarios se cultivaron conjuntamente con células CHLA-255 NB (relación 1: 1) durante 48 horas en condiciones normóxicas (20 % de O₂) o hipóxicas (1 % de O₂) y los sobrenadantes se colocaron en cámaras inferiores de placas de cámaras dobles con membranas de poros de 5 μm con o sin adición de los anticuerpos neutralizantes indicados o su control de isotipo. Las NKT se colocaron en las cámaras superiores y se les permitió migrar durante 3 h. La tasa de migración de las células NKT se cuantificó por FACS. Los resultados son Media ± SD de 3 experimentos por triplicado, **P<0,01, *** P<0,001, ANOVA unidireccional. (B) Los monocitos se cultivaron conjuntamente con o sin células CHLA-255 NB durante 36 horas en condiciones normóxicas o hipóxicas, seguido de aislamiento de ARNm y análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de 11 genes de quimiocinas que se conoce que atraen NKT humanas. Los datos son de un representante de 3 experimentos por triplicado. (C) Los monocitos se cultivaron solos o con células CHLA-255 NB en condiciones hipóxicas o normóxicas durante 48 h. La concentración de CCL20 se cuantificó en los sobrenadantes a partir de las condiciones indicadas mediante el uso de ELISA. (D) Las células se cultivaron como en C y se analizaron para la acumulación intracelular de CCL20 en monocitos CD14⁺ y células NB CD14^{negativas}. Las regiones se establecieron mediante el uso de controles de isotipo correspondientes. (E) Los leucocitos infiltrantes de tumor se aislaron de una suspensión celular de NB primario recientemente resecado mediante una centrifugación en gradiente y se cultivaron con GolgiStop™ durante 4 horas seguido de FACS. Después de activar los eventos CD45⁺, se examinó la acumulación de CCL20 en TAM CD14⁺ (gráfico inferior) y en comparación con el control de isotipo correspondiente (gráfico superior). Los datos son de un representante de tres experimentos.

65 Figura 2: Se requiere CCL20 para la migración de células NKT hacia el cultivo hipóxico de NB/monocitos y tumores NB en ratones hu-NSG. (A) Los monocitos se cultivaron conjuntamente con las células CHLA-255 NB durante 48 horas en condiciones normóxicas o hipóxicas, seguido del análisis de la migración de células NKT *in vitro* con o sin anticuerpos neutralizantes indicados o su control de isotipo como en la Figura 1A. Los resultados son Media ± SD de 3 experimentos

- 5 por triplicado, $P < 0,001$, ANOVA unidireccional. (B) Se establecieron xenoinjertos de las células CHLA255/luc bajo la cápsula renal de ratones huNSG seguido de transferencia i/v de NKT humanos expandidos ex vivo (5×10^7 por ratón) o PBS (control). Justo antes de la transferencia de las células NKT, los ratones recibieron inyecciones i/p de los anticuerpos neutralizantes indicados o su control de isotipo. Los leucocitos infiltrantes de tumor se analizaron por FACS en el día 3 después de la transferencia de células NKT. Después de activar las células hCD45⁺, se identificaron las NKT como eventos CD3⁺Vα24-Jα18⁺. Los datos son de un representante de cinco ratones por grupo. (C) Los gráficos de barras representan valores de $M \pm SD$ de la frecuencia de células NKT infiltrantes de tumores del experimento descrito en B. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ANOVA unidireccional.
- 10 Figura 3: Los mbTNFα en células NB induce la activación de NF-κB en monocitos. (A) Las células NB cultivadas se suspendieron mediante el uso de EDTA al 2 % sin tripsina y se analizaron mediante FACS para la expresión de la superficie celular de mbTNFα en dos líneas de células NB representativas (teñido: control de isotipo, abierto: anti-mbTNFα). (B) Las suspensiones celulares de tumores primarios de NB recién resacados se tiñeron para los marcadores de superficie indicados. La expresión de mbTNFα en la célula NB (derecha) se analizó después de la activación en eventos CD56^{alto}CD45^{negativo} (izquierda). (C) Las células NB se incubaron previamente con 50 ng/ml de anti TNFα humano (Clon 1825, sistema R&D) o mAb de control de isotipo durante 1 hora antes de la adición de monocitos. Se usaron NB y monocitos solos como controles. La concentración de CCL20 en el sobrenadante del cultivo se determinó mediante ELISA después de 36 horas. Los resultados son Media \pm SD de 3 experimentos por triplicado, *** $P < 0,001$, ANOVA unidireccional (D). Los monocitos se cultivaron solos en placas no adherentes o en la parte superior de la monocapa de células NB y con la adición (cuando se indicó) de mAb anti-TNFα o control de isotipo en normoxia o hipoxia durante 16 horas seguido de desprendimiento de monocitos y Western blot para plkBα mediante el uso de β-actina como control de carga. (E) El experimento se preparó como en 0 seguido de la tinción intracelular para IκBα o (F) fosfo-p65 en monocitos después de activar las células NB como eventos CD56^{alto}. (G) Cinética de la expresión de fosfo-p65 en monocitos tras el cocultivo con células NB en condiciones normóxicas e hipóxicas. Los datos son de un representante de tres experimentos.
- 15 20 25
- Figura 4: La viabilidad y la función de las células NKT se inhiben por la hipoxia y se protege por las citocinas. (A) Las NKT en reposo se cultivaron bajo hipoxia o normoxia en ausencia de las citocinas indicadas a 200 U/ml durante 24 horas. La viabilidad celular se evaluó por la tinción de azul tripano. B. Las NKT se cultivaron durante 24 horas como en A seguido de la estimulación con TCR con 6B11 mAb. La liberación de citocinas se cuantificó mediante el ensayo CBAPlex a partir de sobrenadantes de 24 horas. La cantidad de citocinas se normalizó por el por ciento de células viables en las condiciones correspondientes. Los resultados son Media \pm SD de 3 experimentos por triplicado, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ANOVA unidireccional.
- 30 35
- Figura 5. La expresión transgénica de la IL-15 en las NKT las protege de la hipoxia. (A) El esquema de la construcción retroviral usada para transducir NKT. Las NKT proliferantes se transdujeron con el vector retroviral que contenía la IL-15 y las células transducidas se identificaron por FACS mediante el uso de ΔCD34 tag. (B) Las células NKT y NKT/IL15 se marcaron con CFSE y se estimularon con TCR con OKT3 mAb en ausencia o presencia de células NB (relación 1:1) en normoxia o hipoxia (1 millón de células/pocillo). El por ciento de células proliferadas (pérdida de la expresión de CFSE) se cuantificó por FACS después de 5 días de cultivo con la IL-2 (50 U/ml). Los datos son de un representante de cuatro experimentos con NKT de cuatro donantes. (C) El número absoluto de NKT viables se cuantificó después de un cultivo de 5 días mediante el uso de un hemocitómetro y de la tinción con azul de tripano. Se muestran las medias \pm SD de células por condición de cuatro experimentos, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.
- 40 45
- Figura 6. Las NKT transducidas con la IL-15 tienen una actividad antitumoral potente en un modelo de NB metastásico en ratones hu-NSG. Los ratones NSG se irradiaron subletalmente y se transplantaron con células madre positivas a CD34 de sangre del cordón umbilical humano (hu-NSG) o se usaron como control (NSG). Tres meses después de la transferencia de las células madre, los ratones recibieron una inyección i/v de células solas CHLA-255/luc NB 10^6 o seguidas de células NKT o NKT/IL-15 10^7 . El crecimiento tumoral metastásico se monitoreó semanalmente mediante imágenes BL. (A) Imágenes BL representativas de ratones en cada grupo en los intervalos de tiempo indicados después de la inyección de células tumorales. (B) Valores de $M \pm SD$ de uno de dos experimentos con 5 ratones por grupo. *** $P < 0,001$. (C) Los ratones se pretrataron con bloqueo anti-CD1d o mAb de control de isotipo antes de la transferencia de células NKT/IL15. Valores de $M \pm SD$ en la semana 5 de uno de dos experimentos con 5 ratones por grupo. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$.
- 50 55
- Figura 7: El contacto con las células NB y la hipoxia inducen sinérgicamente CCL20 en monocitos humanos. (A) Los monocitos de donar-3 se cultivaron conjuntamente con células CHLA-255 NB en condiciones normóxicas o hipóxicas. Los sobrenadantes se recogieron en los puntos de tiempo indicados y la concentración de CCL20 se midió por ELISA. (B) Los monocitos de donar-11 y las células NB se cultivaron solos o cocultivados en los mismos pocillos o en cámaras Transwell, separados por una membrana de 0,4 μm durante 36 horas. La concentración de CCL20 se midió por ELISA. Los datos son de un representante de tres experimentos. (C) Los monocitos y las células NB se cultivaron solos o se cocultivaron en los mismos pocillos o en cámaras Transwell, separados por una membrana de 0,4 μm durante 36 h. La concentración de CCL20 se midió por ELISA. Los datos son de un representante de tres experimentos.
- 60 65
- Figura 8: Expresión CCR6 en células NKT. Las células NKT primarias de PBMC recién aisladas de dos individuos (PBMC-1 y -2) y las células NKT (línea NKT) expandidas ex vivo se identificaron mediante FACS como eventos positivos a CD3, negativos a Vα24 y positivos a Jα18 (panel izquierdo) y se analizaron para la expresión de CD4 y CCR6 (panel derecho).

Figura 9: Modelo de neuroblastoma en ratones hu-NSG. (A) Los ratones NSG de seis semanas de edad se irradiaron subletalmente y se transplantaron con células madre hematopoyéticas positivas a CD34 de sangre de cordón umbilical humano (SCT). Los monocitos humanos y las células B aparecieron en la sangre periférica a los 2 meses y las células T a los 3 meses después del SCT. Se inyectaron células NB debajo de la cápsula renal o por vía intravenosa (modelo metastásico) a los 3,5 meses después del SCT. La transferencia adoptiva de células NKT se realizó a diferentes intervalos después de la inyección de células tumorales en dependencia de la configuración experimental. (B) Después de dos rondas de selección positiva, las preparaciones de células madre de sangre de cordón tenían > 95 % de células madre positivas a CD34 y <0,1 % de células T positivas a CD3. (C) Los gráficos representativos demuestran una reconstitución típica de monocitos, linfocitos T y B en sangre periférica de ratones hu-NSG en el momento de la inyección de células NB. (D) Tinción de IF de injerto de NB con mAb anti CD45 humano (rojo), aumento 20 X. (E) Análisis FACS de células viables en suspensión tumoral para CD45 y CD14 humanos. (F) Las células monocíticas positivas a CD14 se analizaron para determinar el nivel de expresión de HLA-DR en sangre periférica (izquierda) y en injertos de tumor NB de los mismos animales. Se muestra un representante de cinco ratones. (G) La expresión de HLA-DR (abajo) se analizó en los TAM de tumor primario de NB humano después de la activación en células positivas a CD45, CD33 y CD14 (arriba). Se muestra un representante de tres tumores primarios.

Figura 10. Modelo de neuroblastoma en ratones hu-NSG. (A) Los ratones NSG de seis semanas de edad se irradiaron subletalmente y se transplantaron con células madre hematopoyéticas positivas a CD34 de sangre de cordón umbilical humano (SCT). Los monocitos humanos y las células B aparecieron en la sangre periférica a los 2 meses y las células T a los 3 meses después del SCT. Las células CHLA-255/luc NB se inyectaron debajo de la cápsula renal (modelo ortotópico) o por vía intravenosa (modelo metastásico) a los 3,5 meses después del SCT. La transferencia adoptiva de células NKT se realizó a diferentes intervalos después de la inyección de células tumorales en dependencia de la configuración experimental. (B) El crecimiento tumoral metastásico de las células CHLA-255/luc se comparó en ratones hu-NSG frente a ratones NSG. Los datos de imágenes BL semanales son de representantes de 5 ratones por grupo (C). Los gráficos representativos demuestran una reconstitución típica de monocitos, linfocitos T y B en sangre periférica de ratones hu-NSG en el momento de la inyección de células NB. (D) Tinción de IF de injerto de NB con mAb anti CD45 humano (rojo), aumento 20 X. (E) Análisis por FACS de células viables en suspensión tumoral para CD45 y CD14 (TAM) humanos. (F) Las NKT humanas expandidas *ex vivo* (5×10^7 por ratón) o PBS (control) se inyectaron *i/v* a ratones hu-NSG con injertos ortotópicos de NB establecidos durante 3 semanas. Los leucocitos infiltrantes de tumor se analizaron por FACS en el día 3 después de la transferencia de células NKT. Después de activar las células hCD45⁺, se identificaron las NKT como eventos CD3⁺Va24-Ja18⁺. Los datos son de un representante de cinco ratones por grupo.

Figura 11. Expresión de GD2.CAR funcionales en las NKT. (A) Representación esquemática de los CAR que incorporan porciones coestimuladoras. (B) Expresión típica de una de las construcciones de CAR (14g2a.CD28.OX40.zeta) en NKT expansivas *ex vivo* en los días 7 y 21 después de la transducción retroviral como se detectó mediante el uso de un anticuerpo anti-idiotipo específico 1A7⁹. (C) Citotoxicidad *in vitro* de CAR.GD2 NKT y células T del mismo individuo contra las células CHLA-255 NB positivas a GD2 en el ensayo de liberación de Cr⁵¹ de 4 horas. (D) Citotoxicidad *in vitro* de CAR.GD2 y NKT parentales contra células J32 positivas a CD1d en el ensayo de liberación de Cr⁵¹ de 4 horas. Se muestran los representantes de tres experimentos independientes.

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

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

La Figura 14 muestra la generación y expansión efectiva de CAR.GD2 NKT.

La Figura 15 muestra que las NKT CAR.GD2 están dotadas de doble especificidad frente a los objetivos positivos a GD2 y a CD1d.

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

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

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

La Figura 19 muestra la expresión intracelular de TNF α en líneas celulares de NB. Las células cultivadas de las líneas celulares de NB humanas que se indican se fijaron y se permeabilizaron seguido de la tinción intracelular con los mAb anti-TNF α conjugados con PE (transparente) o control de isotipo (gris). Se muestran los gráficos representativos de FACS de uno de los tres experimentos independientes.

La Figura 20 muestra el efecto diferencial de la IL-15 sobre la apoptosis de células NKT en normoxia e hipoxia. (A) Las NKT se expandieron a partir de PBMC mediante el uso de la estimulación con aGalCer e IL-2 durante 7 días, después se lavaron y se cultivaron en ausencia o presencia de células NB (relación 1:1) en normoxia o hipoxia, con o sin IL-15 a 10 ng/ml durante 24 horas seguido de la tinción para anexina-V y 7-AAD. Se muestran los gráficos representativos de FACS de uno de los cuatro experimentos independientes. (B) Media \pm SD de 4 experimentos, **P<0,01, ***P<0,001.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

De acuerdo con la convención de derecho de patentes de larga data, las palabras "un" y "uno" cuando se usan en la presente descripción junto con la palabra que comprende, que incluye las reivindicaciones, denotan "uno o más". Algunas modalidades de la invención pueden consistir en o consistir esencialmente en uno o más elementos, etapas del método y/o métodos de la invención. Se contempla que cualquier método o composición que se describe en la presente descripción puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descrito en la presente descripción.

El término "cantidad con eficacia terapéutica", como se usa en la presente descripción, se refiere a la cantidad que, cuando se administra a un sujeto o paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad, que incluye mejorar al menos un síntoma de la enfermedad.

II. Ciertas modalidades de la invención

Las células T asesinas naturales (NKT) infiltrantes de tumores se asocian con buenos resultados en diversos tipos de cáncer. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las NKT interactúan con los microambientes tumorales han permanecido enigmáticos, lo que impide el diseño racional de las inmunoterapias que se basan en las NKT. Las NKT se localizan conjuntamente con macrófagos asociados a tumores en una respuesta innata a la hipoxia inducida por tumores que se identificó recientemente. La descripción proporciona la modificación genética de las NKT. En modalidades específicas, las NKT se modifican genéticamente para mejorar su crecimiento bajo condiciones hipóxicas y facilitar su actividad antitumoral.

La hipoxia es una característica fundamental de los tumores malignos, como el neuroblastoma, que reduce la efectividad de los agentes terapéuticos convencionales. Los inventores han identificado una respuesta inmunitaria innata novedosa a la hipoxia inducida por tumores, y en las modalidades de la invención existe una manipulación de las células efectoras de esta respuesta para proporcionar inmunoterapia contra el cáncer. La invención proporciona información crítica sobre los mecanismos por los cuales los linfocitos NKT se infiltran en los tumores e interactúan con el microambiente tumoral hipóxico. Puede aplicarse tecnología innovadora de modificación genética celular para modificar selectivamente tejidos hipóxicos dentro del neuroblastoma (por ejemplo) para inmunoterapia con las NKT. Estas células modificadas genéticamente pueden combinarse con otras formas de inmunoterapia, como las células T específicas de tumores, por ejemplo. La terapia con células NKT dirigidas a la hipoxia se aplica ampliamente en diversos tipos de cáncer en niños y adultos.

Por lo tanto, en base a la experiencia con 1) NKT humanas, 2) construcciones de fusión con un dominio de degradación dependiente de oxígeno, y 3) receptores de antígeno quimérico (CAR) para la terapia con células T, puede 1) descubrirse el mecanismo de localización de células NKT a los tumores hipóxicos; 2) modificar genéticamente las NKT, por ejemplo, para expresar ciertos compuestos de una manera dependiente del oxígeno para mejorar su supervivencia y actividad antitumoral; y 3) evaluar la inmunoterapia combinada con las células NKT y CAR-T específicas de tumores.

Las modalidades de la presente invención abarcan el reconocimiento específico del microambiente tumoral y/o el reconocimiento específico de las células tumorales por las células NKT. Las células NKT se modifican genéticamente para abarcar un receptor de antígeno quimérico, y en algunas modalidades, las células NKT se modifican genéticamente para expresar la IL-15, la IL-2, la IL-4 y/o la IL-7.

En las modalidades de la invención, existe una inmunoterapia eficaz contra el cáncer que usa las NKT de acuerdo con la presente descripción que aumenta su capacidad de atacar las células tumorales y atacar los tejidos que soportan su crecimiento. Las NKT se localizan en el sitio del tumor en pacientes con neuroblastoma, por ejemplo, y atacan a las células no malignas que se denominan macrófagos asociados al tumor, que proporcionan un soporte crítico para la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales. Para funcionar bien, las NKT deben sobrevivir en el ambiente hostil; tras la modificación genética con un factor de supervivencia como la IL-15 y/o con una molécula dirigida al cáncer que se denomina CAR.GD2, las NKT sobrevivirán en el sitio del tumor y tendrán eficacia antitumoral tras matar el cáncer directamente y alterar el ambiente de soporte. Como prueba de principio, las NKT de pacientes con neuroblastoma se modificaron genéticamente para que pudieran producir la IL-15 y tener en su superficie nuevos componentes (CAR.GD2)

que pudieran reconocer directamente las células tumorales. El uso antitumoral de estas NKT modificadas genéticamente se caracteriza mediante el uso de sistemas experimentales *in vitro* e *in vivo*. Pueden utilizarse las NKT modificadas genéticamente en pacientes con neuroblastoma.

5 La presente descripción incluye NKT humanas modificadas genéticamente y estrategia inmunoterapéutica novedosa para emplearlas. En modalidades específicas, las NKT dirigidas a los TAM se habilitan con una especificidad adicional contra los neuroblastos mediante el uso de CAR.GD2, que en sí mismo ha demostrado ser eficaz en pacientes con NB recurrente cuando se expresa en células T citotóxicas. La expresión de la IL-15 en las NKT facilita la supervivencia y la actividad antitumoral de las células NKT en pacientes con cáncer. Además, en algunas modalidades existe un cambio suicida en vectores en las NKT para garantizar la seguridad del uso clínico posterior de las NKT modificadas genéticamente. Puede utilizarse un modelo único de NB en ratones humanizados que permita la evaluación de la localización tumoral de NKT humanas y su interacción no solo con células NB humanas sino también con TAM humanos en los tejidos tumorales. La construcción CAR.GD2 seleccionada puede prepararse como material de grado clínico, en ciertos aspectos. Debido a su capacidad inherente para modificar el estroma de soporte tumoral, los CAR de las NKT en algunas modalidades son más efectivos que los CAR de las células T en muchas neoplasias malignas en adultos y niños. Por lo tanto, una plataforma terapéutica que se basa en células NKT permite un efecto importante en la terapia de las células cancerosas.

En la presente descripción, se proporciona una inmunoterapia eficaz contra el cáncer mediante el uso de propiedades naturales y de modificación genética de las células T asesinas naturales (NKT) reactivas a CD1d invariantes de Vα24 para modificar tanto las células estromales que soportan el tumor como las propias células tumorales. Las NKT infiltrantes de tumores se asocian con buenos resultados en diversos tipos de cáncer. Hallazgos recientes sugieren que, en lugar de modificar directamente a las células tumorales, las NKT se dirigen a los macrófagos asociados a tumores (TAM) positivos a CD1d, que proporcionan un soporte estromal esencial para las células tumorales. Las NKT son atraídas e inhibidas por los TAM hipóxicos en el neuroblastoma (NB) y su actividad antimetastásica puede rescatarse mediante la expresión transgénica de la IL-15. Sin embargo, además de modificar el estroma de soporte tumoral, la terapia curativa también puede requerir un ataque directo y específico contra las células tumorales. Por lo tanto, en las modalidades de la invención están presentes NKT humanas transducidas con un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se dirige al antígeno GD2 expresado por los neuroblastos (CAR.GD2) y representa un objetivo terapéutico clínicamente validado en el NB. La expresión transgénica de CAR.GD2 hace que las NKT sean altamente citotóxicas contra los neuroblastos, al tiempo que conservan la especificidad de TCR nativa y la capacidad de matar los TAM. En base a los éxitos clínicos recientes con los CAR de las células T, se generaron nuevas construcciones de CAR.GD2 que codifican a los endodominios coestimuladores (CD28, OX40 o CD137) con o sin IL-15. Para garantizar la seguridad y la aplicabilidad clínica de la modificación genética, las modalidades de la invención abarcan la expresión transgénica de CAR.GD2 e IL-15 con la expresión de la caspasa-9 inducible ilustrativa, que forma un cambio suicida. Por lo tanto, las modalidades de la invención incluyen un vector bi/tricistronico que codifica a CAR.GD2 que contiene un endodominio coestimulador y/o la IL-15 acoplada con el cambio suicida inducible, ya que dichas NKT muestran una supervivencia y funciones efectoras antitumorales mejoradas de forma segura dentro del ambiente tumoral del NB. También se incluyen en la descripción los modelos de NB ortotópico y metastásico en ratones humanizados que permiten la evaluación *in vivo* de la actividad dual específica de las células NKT contra injertos de NB humanos que contienen TAM humanos.

40 III. Modalidades de receptores quiméricos de la invención y sus usos

En algunas modalidades, las células NKT se modifican genéticamente para comprender una construcción de expresión que codifica a la IL-15, la IL-2, la IL-4 y/o la IL-7 y además comprenden un receptor de antígeno quimérico.

45 En modalidades de la invención, se utiliza un receptor de antígeno quimérico (CAR) que es una fusión modificada genéticamente de fragmentos variables de cadena única (scFv), derivados de anticuerpos monoclonales, que se fusionan con el dominio transmembrana CD3-zeta (por ejemplo) y endodominio(s) intracelular(es). En modalidades de la invención, están presentes receptores quiméricos que se dirigen a GD2. En casos específicos, están presentes construcciones de expresión que codifican dichos receptores quiméricos. En algunas modalidades, las construcciones de expresión están presentes en una célula NKT.

En modalidades específicas, las moléculas CAR dan como resultado la transmisión de una señal zeta en respuesta al reconocimiento por parte del scFv de su objetivo. Un ejemplo de dicho objetivo es el disialogangliósido GD2, por ejemplo. Las células NKT pueden transducirse con una construcción de expresión que codifica el CAR, y dicha transducción puede ser una transducción de vector oncoretroviral, por ejemplo. El uso de la célula NKT permite reconocer y matar células objetivo que expresan GD2 (por ejemplo, células de neuroblastoma).

60 Aunque en modalidades particulares se emplea cualquier dominio intracelular adecuado en los receptores quiméricos de la invención, en modalidades específicas este es parte o la totalidad de la cadena zeta de CD3. En modalidades específicas, los dominios intracelulares de señalización del receptor son los del complejo receptor de antígeno de las células T, como la cadena zeta de CD3, también los dominios de señalización coestimuladora RIII Fcγ, CD28, DAP10, CD2, solos o en una serie con CD3 zeta, por ejemplo. En modalidades específicas, el dominio intracelular (que puede denominarse dominio citoplasmático) comprende parte o la totalidad de una o más cadenas TCR Zeta, CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, FcεR1γ, ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132 y CD40. Pueden emplearse uno o múltiples dominios citoplasmáticos, ya que los denominados CAR de tercera generación tienen al menos 2 o 3 dominios

de señalización fusionados para un efecto aditivo o sinérgico, por ejemplo.

Puede producirse un inmunorreceptor por cualquier medio que se conoce en la técnica, aunque preferentemente se produce mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. Una secuencia de ácido nucleico que codifica las diversas regiones del receptor quimérico puede prepararse y ensamblarse en una secuencia de codificación completa mediante técnicas estándar de clonación molecular (screening de biblioteca genómica, PCR, ligación asistida por cebador, mutagénesis dirigida al sitio, etc.). La región de codificación resultante se inserta preferentemente en un vector de expresión y se usa para transformar una línea celular huésped de expresión adecuada, preferentemente células NKT, y las células NKT pueden ser autólogas, en ciertos aspectos, aunque en otros casos pueden ser alogénicas.

Las dosis adecuadas para un efecto terapéutico estarían entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^9 células por dosis, preferentemente en una serie de ciclos de dosificación. Un régimen de dosificación preferido consiste en cuatro ciclos de dosificación de una semana de dosis ascendentes, que comienza a aproximadamente 10^7 células en el día 0, aumenta incrementalmente hasta una dosis objetivo de aproximadamente 10^8 células para el día 5. Los modos de administración adecuados incluyen inyección intravenosa, subcutánea, intracavitaria (por ejemplo, mediante un dispositivo de acceso al depósito), intraperitoneal e inyección directa en una masa tumoral.

Como se usa en la presente descripción, una construcción de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico tiene el propósito de denotar una molécula de ADN que puede transformarse o introducirse en una célula NKT y transcribirse y traducirse para producir un producto (por ejemplo, un receptor quimérico).

En la construcción de ácido nucleico que se emplea en la presente invención, el promotor está operativamente unido a la secuencia de ácido nucleico que codifica al receptor quimérico de la presente invención, es decir, están posicionados para promover la transcripción del ARN mensajero desde el ADN que codifica al receptor quimérico. El promotor puede ser de origen genómico o se genera sintéticamente. Una variedad de promotores para su uso en células T se conocen bien en la materia (por ejemplo, LTR nativa del vector gammaretroviral, PGK y EF1), y en algunos casos los promotores son inducibles. El promotor puede ser constitutivo o inducible, donde la inducción se asocia con el tipo de célula específico o un nivel específico de maduración, por ejemplo. Alternativamente, también son adecuados varios promotores virales que se conocen bien. Los promotores de interés incluyen el promotor de β -actina, los promotores SV40 temprano y tardío, el promotor de inmunoglobulina, el promotor de citomegalovirus humano, el promotor de retrovirus y el promotor de virus formadores de foco en el bazo de Friend. Los promotores pueden asociarse o no con potenciadores, en donde los potenciadores pueden asociarse naturalmente con el promotor particular o asociarse con un promotor diferente.

La secuencia del marco de lectura abierto que codifica al receptor quimérico puede obtenerse de una fuente de ADN genómico, una fuente de ADNc, o puede sintetizarse (por ejemplo, mediante PCR), o combinaciones de estos. En dependencia del tamaño del ADN genómico y el número de intrones, puede ser conveniente usar ADNc o una combinación de estos, ya que se considera que los intrones estabilizan el ARNm o proporcionan expresión específica de células NKT. Además, puede ser más ventajoso usar regiones no codificantes endógenas o exógenas para estabilizar el ARNm.

Para la expresión de un receptor quimérico, la región de iniciación transcripcional endógena o natural de la secuencia de ácido nucleico que codifica el componente N-terminal del receptor quimérico puede usarse para generar el receptor quimérico en el huésped objetivo. Alternativamente, puede usarse una región de iniciación transcripcional exógena que permita la expresión constitutiva o inducible, en donde la expresión puede controlarse en dependencia del huésped objetivo, el nivel de expresión deseado, la naturaleza del huésped objetivo y similares.

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

De manera similar, una región de terminación puede proporcionarse por la región de terminación transcripcional endógena o natural de la secuencia de ácido nucleico que codifica al componente C-terminal del receptor quimérico. Alternativamente, la región de terminación puede derivarse de una fuente diferente. En su mayor parte, la fuente de la región de terminación generalmente no se considera crítica para la expresión de una proteína recombinante y puede emplearse una amplia variedad de regiones de terminación sin afectar negativamente la expresión.

Como apreciará un experto en la materia, en algunos casos, pueden eliminarse algunos aminoácidos en los extremos del GD2, generalmente no más de 10 residuos, más generalmente no más de 5, por ejemplo. Además, puede ser conveniente introducir una pequeña cantidad de aminoácidos en los bordes, generalmente no más de 10 residuos, más generalmente no más de 5. La eliminación o inserción de aminoácidos puede ser un resultado de las necesidades de la construcción, que proporciona sitios de restricción convenientes, facilidad de manipulación, mejora en los niveles de expresión, o similares. Además, el sustituto de uno o más aminoácidos con un aminoácido diferente puede ocurrir por razones similares, generalmente no sustituye más de aproximadamente cinco aminoácidos en cualquier dominio.

La construcción quimérica que codifica al receptor quimérico que se emplea en la invención puede prepararse de formas

convencionales. Debido a que, en su mayor parte, pueden emplearse secuencias naturales, los genes naturales pueden aislarse y manipularse, según corresponda, para permitir la unión adecuada de los diversos componentes. Por lo tanto, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas N-terminal y C-terminal del receptor quimérico pueden aislarse tras el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante el uso de cebadores apropiados que dan como resultado la eliminación de las porciones que no se desean del gen. Alternativamente, pueden usarse digestiones de restricción de genes clonados para generar la construcción quimérica. En cualquier caso, las secuencias pueden seleccionarse para proporcionar sitios de restricción que tengan extremos romos, o que tengan solapamientos complementarios.

Las diversas manipulaciones para preparar la construcción quimérica pueden llevarse a cabo *in vitro* y en modalidades particulares, la construcción quimérica se introduce en vectores para la clonación y expresión en un huésped apropiado mediante el uso de métodos estándar de transformación o transfección. Por lo tanto, después de cada manipulación, se clona la construcción resultante de la unión de las secuencias de ADN, se aísla el vector y se selecciona la secuencia para asegurar que la secuencia codifique el receptor quimérico deseado. La secuencia puede seleccionarse mediante análisis de restricción, secuenciación o similares.

Las construcciones quiméricas de la presente invención encuentran aplicación en sujetos que tienen o se sospecha que tienen cáncer tras reducir el tamaño de un tumor o impedir el crecimiento o re-crecimiento de un tumor en estos sujetos. Por consiguiente, las modalidades de la presente invención se refieren además a un método para reducir el crecimiento o impedir la formación de tumores en un sujeto mediante la introducción de una construcción quimérica de la presente invención en una célula NKT aislada del sujeto y reintroducir en el sujeto la célula NKT transformada, lo que produce de esta manera respuestas antitumorales para reducir o eliminar tumores en el sujeto. Como conoce bien un experto en la materia, varios métodos están disponibles fácilmente para aislar estas células de un sujeto, por ejemplo, mediante el uso de la expresión del marcador de superficie celular o mediante el uso de kits disponibles comercialmente (*por ejemplo*, ISOCELL™ de Pierce, Rockford, Ill.).

Se contempla que la construcción quimérica pueda introducirse en las propias células NKT del sujeto como ADN desnudo o en un vector adecuado. Los métodos para transfectar establemente las células T por electroporación mediante el uso de ADN desnudo se conocen en la materia. Véase, *por ejemplo*, la Patente de Estados Unidos núm. 6,410,319. El ADN desnudo generalmente se refiere al ADN que codifica un receptor quimérico de la presente invención contenido en un vector de expresión de plásmido en la orientación adecuada para la expresión. Ventajosamente, el uso de ADN desnudo reduce el tiempo que se requiere para producir células T que expresan el receptor quimérico de la presente invención.

Alternativamente, un vector viral (*por ejemplo*, un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector viral adenoasociado, o un vector lentiviral) puede usarse para introducir la construcción quimérica en células NKT. Los vectores adecuados para su uso de acuerdo con el método de la presente invención no se replican en las células NKT del sujeto. Se conoce una gran cantidad de vectores que se basan en virus, donde el número de copias del virus que se mantiene en la célula es lo suficientemente bajo como para mantener la viabilidad de la célula. Los vectores ilustrativos incluyen los vectores pFB-neo (STRATAGENE®) descritos en la presente descripción, así como los vectores que se basan en VIH, SV40, EBV, HSV o BPV.

Una vez que se establece que la célula NKT transfectada o transducida es capaz de expresar el receptor quimérico como una proteína de membrana superficial con la regulación deseada y al nivel deseado, puede determinarse si el receptor quimérico es funcional en la célula huésped para proporcionar la señal de inducción deseada. Posteriormente, las células NKT transducidas se reintroducen o administran al sujeto para activar respuestas antitumorales en el sujeto. Para facilitar la administración, las células NKT transducidas de acuerdo con la invención pueden convertirse en una composición farmacéutica o en un implante apropiado para la administración *in vivo*, con portadores o diluyentes apropiados, que además pueden ser farmacéuticamente aceptables. Los medios para preparar una composición o un implante de este tipo se han descrito en la materia (véase, *por ejemplo*, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed., Mack, ed. (1980)). Donde sea apropiado, las células T transducidas pueden formularse en una preparación en forma semisólida o líquida, como una cápsula, una solución, una inyección, un inhalante o aerosol, de la manera habitual para su respectiva vía de administración. Los medios que se conocen en la materia pueden utilizarse para prevenir o minimizar la liberación y absorción de la composición hasta que alcance el tejido u órgano objetivo, o para asegurar la liberación programada de la composición. Sin embargo, convenientemente, se emplea una forma farmacéuticamente aceptable que no afecta las células que expresan el receptor quimérico. Por lo tanto, convenientemente, las células T transducidas pueden convertirse en una composición farmacéutica que contiene una solución salina equilibrada, preferentemente solución salina equilibrada de Hanks, o solución salina normal.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede usarse sola o en combinación con otros agentes bien establecidos útiles para tratar el cáncer. Ya sea que se administre sola o en combinación con otros agentes, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse *por medio de* varias vías y a varios sitios en un cuerpo de mamífero, particularmente humano, para lograr un efecto particular. Un experto en la materia reconocerá que, aunque puede usarse más de una vía para la administración, una vía particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra vía. Por ejemplo, la administración intradérmica puede usarse ventajosamente sobre la inhalación para el tratamiento del melanoma. La administración local o sistémica puede lograrse mediante la administración que comprende la aplicación o instilación de la formulación en las cavidades corporales, la inhalación o insuflación de un

aerosol, o mediante introducción parenteral, que comprende la administración intramuscular, intravenosa, intraportal, intrahepática, peritoneal, subcutánea o intradérmica.

5 Puede proporcionarse una composición de la presente invención en forma de dosificación unitaria en donde cada unidad de dosificación, *por ejemplo*, una inyección, contiene una cantidad predeterminada de la composición, sola o en combinación apropiada con otros agentes activos. El término forma de dosificación unitaria como se usa en la presente descripción se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de la composición de la presente invención, sola o en combinación con otros agentes activos, calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, en asociación con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable, donde sea apropiado. Las descripciones para las formas de dosificación unitaria novedosas de la presente invención dependen de la farmacodinámica particular asociada con la composición farmacéutica en el sujeto particular.

15 Convenientemente, una cantidad eficaz o un número suficiente de las células T transducidas aisladas está presente en la composición y se introduce en el sujeto de tal manera que se establezcan respuestas antitumorales, específicas, a largo plazo para reducir el tamaño de un tumor o eliminar el crecimiento o la reaparición del tumor que de lo contrario se produciría en ausencia de dicho tratamiento. Convenientemente, la cantidad de células T transducidas que se reintroducen en el sujeto causa un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 100 % de disminución en el tamaño del tumor en comparación con otras condiciones en donde las células T transducidas no están presentes.

20 Por consiguiente, la cantidad de células NKT transducidas que se administra debe tener en cuenta la vía de administración y debe ser tal que se introduzca un número suficiente de células NKT transducidas para lograr la respuesta terapéutica deseada. Además, las cantidades de cada agente activo incluidas en las composiciones descritas en la presente descripción (*por ejemplo*, la cantidad por cada célula a contactar o la cantidad por cierto peso corporal) pueden variar en diferentes aplicaciones. En general, la concentración de células NKT transducidas convenientemente debería ser suficiente para proporcionar al sujeto que está siendo tratado al menos de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^9 células NKT transducidas, aún más convenientemente, de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 5×10^8 células T transducidas, aunque cualquier cantidad adecuada puede utilizarse, ya sea por arriba, *por ejemplo*, mayor que 5×10^8 células, o por debajo, *por ejemplo*, menos de 1×10^7 células. El programa de dosificación puede basarse en terapias bien establecidas que se basan en células (véase, *por ejemplo*, Topalian y Rosenberg (1987) Acta Haematol. 78 Supl. 1:75-6; Patente de los Estados Unidos núm. 4,690,915) o puede emplearse una estrategia alternativa de infusión continua.

35 Estos valores proporcionan una guía general del intervalo de células NKT transducidas para ser utilizadas por el profesional tras optimizar el método de la presente invención para la práctica de la invención. La mención en la presente descripción de tales intervalos de ninguna manera excluye el uso de una cantidad mayor o menor de un componente, como podría garantizarse en una aplicación particular. Por ejemplo, la dosis y el programa reales pueden variar en dependencia de si las composiciones se administran en combinación con otras composiciones farmacéuticas, o en dependencia de las diferencias interindividuales en la farmacocinética, la disposición del fármaco y el metabolismo. Un experto en la materia puede hacer fácilmente cualquier ajuste necesario de acuerdo con las exigencias de la situación particular.

IV. Terapia de Combinación

45 En ciertas modalidades de la invención, los métodos de la presente invención para aspectos clínicos se combinan con otros agentes efectivos en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, tales como agentes anticancerígenos. Un agente "anticancerígeno" es capaz de afectar negativamente el cáncer en un sujeto, por ejemplo, tras matar las células cancerosas, inducir la apoptosis en células cancerosas, reducir la tasa de crecimiento de las células cancerosas, reducir la incidencia o número de metástasis, reducir el tamaño del tumor, inhibir el crecimiento tumoral, reducir el suministro de sangre a un tumor o a las células cancerosas, promover una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas o el tumor, prevenir o inhibir la progresión del cáncer, o aumentar la duración de la vida de un sujeto con cáncer. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad combinada eficaz para matar o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede involucrar el contacto de las células cancerosas con la construcción de expresión y el(los) agente(s) o factor(es) múltiple(s) al mismo tiempo. Esto puede lograrse tras poner en contacto la célula con una composición o formulación farmacológica única que incluye ambos agentes, o tras poner en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en donde una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye el(los) otro(s) agente(s).

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

65 La presente terapia inventiva puede preceder o seguir al otro tratamiento del agente por intervalos que varían de minutos a semanas. En las modalidades donde el otro agente y la presente invención se aplican al individuo separadamente,

5 generalmente podría asegurarse que un período significativo de tiempo no expire entre el tiempo de cada administración, de manera que el agente y la terapia inventiva podrían aún ser capaces de ejercer ventajosamente un efecto combinado sobre la célula. En dichos casos, se contempla que puede ponerse en contacto la célula con ambas modalidades dentro de aproximadamente 12-24 horas entre sí y, más preferentemente, dentro de aproximadamente 6-12 horas entre sí. En algunas situaciones, puede desearse extender significativamente el período de tiempo para el tratamiento, sin embargo, cuando varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) se extienden entre las administraciones respectivas.

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

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

15 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

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

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

A. Quimioterapia

25 En algunas modalidades, la invención se emplea con quimioterapia. Aunque la quimioterapia puede ser de cualquier tipo, en modalidades específicas la quimioterapia es útil para el neuroblastoma. En modalidades específicas, la quimioterapia comprende Adriamycin PFS (clorhidrato de doxorubicina); Adriamycin RDF (clorhidrato de doxorubicina); Clafen (ciclofosfamida); Ciclofosfamida; Cytosan (ciclofosfamida); Clorhidrato de doxorubicina; Neosar (ciclofosfamida); Vincasar PFS (sulfato de vincristina); y/o sulfatos de vincristina.

30 Las terapias contra el cáncer también incluyen una variedad de terapias combinadas con tratamientos químicos y radiológicos. Las quimioterapias combinadas incluyen, por ejemplo, abraxane, altretamina, docetaxel, herceptina, metotrexato, novantrone, zoladex, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalan, clorambucilo, busulfan, nitrosurea, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógenos, taxol, gemcitabina, navelbine, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o variante derivada de lo anterior.

B. Radioterapia

40 Otros factores que causan daño en el ADN y se han usado extensamente incluyen lo que comúnmente se conoce como rayos γ, rayos X y/o la administración dirigida de radioisótopos a las células tumorales. Además, se contemplan otras formas de factores que dañan el ADN, tales como microondas y radiación UV. Es muy probable que todos estos factores ocasionen un amplio intervalo de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN, y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens por períodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la vida media del isótopo, la fuerza y el tipo de radiación emitida, y la absorción por las células neoplásicas.

50 Los términos "se puso en contacto" y "se expuso", cuando se aplican a una célula, se usan en la presente descripción para describir el proceso mediante el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se administran a una célula objetivo o se colocan en yuxtaposición directa con la célula objetivo. Para alcanzar la muerte de la célula o la estasis, ambos agentes se administran a una célula en una cantidad combinada eficaz para matar a la célula o impedir que se divida.

C. Inmunoterapia

55 Los inmunoterapéuticos generalmente dependen del uso de células y moléculas efectoras inmunitarias para modificar y destruir las células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de la terapia o puede reclutar otras células para ocasionar realmente la muerte de la célula. El anticuerpo puede conjugarse, además, con un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina pertussis, *etcétera*) y sirve meramente como agente de reconocimiento específico. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que porta una molécula de superficie que interactúa, directa o indirectamente, con una célula tumoral objetivo. Diversas células efectoras incluyen las células T citotóxicas y células NK.

65 Así, la inmunoterapia podría usarse como parte de una terapia combinada, junto con la presente terapia celular. El enfoque general para la terapia combinada se discute a continuación. Generalmente, la célula tumoral debe llevar algún marcador

que sea susceptible al reconocimiento específico, es decir, que no esté presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para el reconocimiento específico en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen el antígeno carcinoembrionario, el antígeno prostático específico, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p155.

D. Genes

En aún otra modalidad, el tratamiento secundario es una terapia génica en la que se administra un polinucleótido terapéutico antes, después, o al mismo tiempo que las modalidades clínicas de la presente invención. Una variedad de productos de expresión se abarca dentro de la invención, que incluyen inductores de proliferación celular, inhibidores de proliferación celular, o reguladores de muerte celular programada.

E. Cirugía

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

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

Después de la escisión de parte de la totalidad de las células cancerosas, tejido, o tumor, puede formarse una cavidad en el cuerpo. El tratamiento puede realizarse mediante perfusión, inyección directa o aplicación local del área con una terapia adicional contra el cáncer. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser también de dosis variables.

F. Otros agentes

Se contempla que pueden usarse otros agentes en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que afectan la regulación positiva de los receptores y las uniones GAP de la superficie celular, citostáticos y agentes de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, o agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores apoptóticos. Los agentes inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral; el interferón alfa, beta y gamma; la IL-2 y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocinas; o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES y otras quimiocinas. Se contempla además que la regulación positiva de los receptores de la superficie celular o sus ligandos tales como el ligando Fas/Fas, DR4 o DR5/TRAIL potenciaría las capacidades inductoras de la apoptosis de la presente invención mediante el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino sobre las células hiperproliferativas. Los aumentos en la señalización intercelular mediante la elevación del número de uniones GAP aumentarían los efectos antihiperproliferativos en la población de células hiperproliferativas vecinas. En otras modalidades, pueden usarse agentes citostáticos o de diferenciación en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia antihiperproliferativa de los tratamientos. Se contemplan inhibidores de la adhesión celular para mejorar la eficacia de la presente invención. Ejemplos de inhibidores de adhesión celular son los inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés) y la Lovastatina. Se contempla además que otros agentes que aumenten la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tal como el anticuerpo c225, podrían usarse en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia del tratamiento.

V. Kits

Cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, una construcción de expresión, uno o más reactivos para generar una construcción de expresión, las células para la transfección de la construcción de expresión, y/o uno o más instrumentos para obtener células autólogas para la transfección de la construcción de expresión (tal instrumento puede ser una jeringa, pipeta, fórceps y/o cualquier aparato aprobado médicamente) que puede proporcionarse en el kit. El kit también comprende uno o más agentes quimioterapéuticos, que incluyen uno o más agentes quimioterapéuticos para el neuroblastoma, por ejemplo.

Los kits pueden comprender una o más composiciones alicuotadas adecuadamente de la presente invención o reactivos para generar composiciones de la descripción. Los componentes de los kits pueden envasarse en medios acuosos o en forma liofilizada. Los medios contenedores de los kits pueden incluir al menos un vial, un tubo de ensayo, un matraz, una botella, una jeringa u otro medio contenedor, en el que un componente puede colocarse, y preferentemente, alicuotarse adecuadamente. Cuando se presenta más de un componente en el kit, el kit también generalmente contendrá un segundo, tercer u otro contenedor adicional en el que los componentes adicionales pueden colocarse separadamente. Sin embargo,

varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits también incluirán típicamente un medio para contener la construcción del receptor quimérico y cualquier otro recipiente de reactivo en confinamiento cerrado para la venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes plásticos moldeados por inyección o soplado en los que se retienen los viales deseados, por ejemplo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las modalidades preferidas de la invención. Sin embargo, estos no deberán interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance amplio de la invención.

Ejemplo 1

Los macrófagos asociados al tumor asfixian a las células nkt: un mecanismo de escape inmunitario y un objetivo para la terapia

Las células T asesinas naturales (NKT) invariantes de Vα24 inhiben el crecimiento tumoral *por medio del* reconocimiento específico de macrófagos asociados a tumores (TAM). La progresión tumoral, por lo tanto, requiere que los TAM evadan la actividad de las células NKT *por medio de* un mecanismo que aún no se conoce. En modalidades, está presente un subconjunto de células en líneas celulares de neuroblastoma (NB) y los tumores primarios expresan TNFα unido a la membrana (mb). Estas células tumorales proinflamatorias inducen la producción de la quimiocina CCL20 a partir de los TAM *por medio de* la activación de la vía de señalización NF-κB, un efecto que se amplifica en la hipoxia. Los análisis de citometría de flujo de tumores primarios humanos NB revelaron una acumulación selectiva de CCL20 en los TAM. La neutralización de la quimiocina inhibió *in vitro* la migración de las NKT hacia los monocitos hipóxicos condicionados por el tumor e *in vivo* la localización en injertos de NB en ratones humanizados NOD/SCID/IL2rgamma (nulo) (hu-NSG). La hipoxia deteriora la viabilidad y la función de las células NKT, de modo que el tráfico de las células NKT hacia los TAM que producen la CCL20 sirve como una trampa hipóxica para las NKT infiltrantes de tumores. La IL-15 protegió a las NKT de la hipoxia, y la expresión transgénica de IL-15 en las NKT transferidas adoptivamente mejoró dramáticamente su actividad antimetastásica en comparación con las NKT parentales en el modelo hu-NSG. Por lo tanto, la producción de CCL20 inducida por tumores en los TAM hipóxicos y la consiguiente quimioatracción e inhibición de las NKT representa un mecanismo novedoso de escape inmunitario que puede revertirse mediante inmunoterapia adoptiva con las NKT transducidas con IL-15.

Ejemplo 2

El contacto con las células de nb y la hipoxia inducen sinérgicamente la ccl20 en monocitos humanos

Para explicar la co-localización que se observa de las NKT con los TAM en NB humano primario (Song y otros, 2009), se consideró que los TAM tras la influencia de las células tumorales y/o el ambiente hipóxico quimioatraían activamente a las NKT. Para caracterizar además esto, los inventores realizaron un experimento de migración *in vitro* mediante el uso de pocillos de doble cámara separados por una membrana de poros de 5 μM. Las NKT humanas expandidas *ex vivo* se adicionaron a las cámaras superiores y se les permitió migrar durante 3 horas hacia los pocillos inferiores, que contenían células CHLA-255 NB, monocitos humanos recién aislados (selección negativa) de sangre periférica, o una mezcla 1:1 de células NB y monocitos. Antes de adicionar las NKT, las placas con células NB y monocitos se incubaron en condiciones normóxicas (20 % de O₂) o hipóxicas (1 % de O₂) durante 48 horas. De acuerdo con observaciones previas, las células NB fueron quimioatrayentes para las NKT en condiciones normóxicas (Metelitsa y otros, 2004). Sorprendentemente, la migración de las células NKT a las células NB estuvo casi anulada en la hipoxia (Figura 1A). Por el contrario, la tasa de migración de las células NKT hacia el cocultivo de células NB con monocitos casi se duplicó en condiciones hipóxicas (P < 0,001), mientras que los monocitos solos tenían poca actividad quimioatrayente en normoxia o hipoxia. Estos datos sugieren que una interacción entre las células NB y los monocitos bajo hipoxia da como resultado la inducción (regulación positiva) de quimiocinas que quimioatraen a las NKT.

Para examinar el efecto general de la hipoxia en el perfil de expresión génica de la quimiocina de células NB y monocitos, incubamos monocitos y células CHLA-255 NB en condiciones normóxicas o hipóxicas durante 36 horas seguido de aislamiento de ARN y RT-PCR cuantitativa para los genes de quimiocinas 11 CC y CXC que se conoce que tienen receptores correspondientes en las NKT humanas (Metelitsa y otros, 2004; Kim y otros, 2002; Kim y otros, 2002; Thomas y otros, 2003; Song y otros, 2007). La figura 1B demuestra que la expresión de ARNm de CCL20, CCL5, CCL4 y CCL3 se reguló positivamente, mientras que la de CCL2 se reguló negativamente en hipoxia en comparación con normoxia (P < 0,001). A diferencia de otras quimiocinas, CCL2 se expresa a niveles altos en células NB y experimentos adicionales con células NB solas confirmaron que la hipoxia regula negativamente la expresión de CCL2 en células NB tanto a niveles de ARN como de proteínas. Este hallazgo explica la pérdida observada de la quimioatracción de las células NB para las NKT en la hipoxia. Para examinar si la regulación positiva de la expresión de ARNm de CCL20, CCL5, CCL4 y CCL3 da como resultado una mayor producción de las proteínas correspondientes, se analizaron los sobrenadantes de las mismas condiciones experimentales mediante ELISA y se descubrió que solo la producción de CCL20 se había regulado positivamente en el cocultivo de monocitos con células NB en comparación con los monocitos solos (las células NB no producen CCL20 detectable). Además, el efecto del cocultivo sobre la regulación positiva de CCL20 se amplificó hasta 70 veces en condiciones hipóxicas en comparación con condiciones normóxicas (P < 0,001, Figura 1C). A pesar de la

variabilidad observada en la magnitud de la producción de CCL20 por los monocitos de 13 individuos diferentes, la hipoxia se incrementó invariablemente en todos los casos. El análisis cinético demostró que la regulación positiva de CCL20 alcanzó el máximo después de 36 horas de cocultivo en normoxia, pero continuó en aumento durante al menos 48 horas en hipoxia (Figura 7A).

5 Para determinar inequívocamente la fuente celular de CCL20, cultivamos monocitos solos o con células NB en condiciones normóxicas o hipóxicas y analizamos la acumulación intracelular de CCL20 por FACS mediante el uso de una tinción de superficie para CD14 para discriminar monocitos de células NB. La Figura 1D demuestra que el contacto con las células NB o la hipoxia sola podrían regular positivamente la producción de CCL20 en los monocitos. El nivel más alto de expresión de CCL20 se logró cuando los monocitos se cultivaron conjuntamente con células NB en hipoxia, lo cual es consistente con los resultados del ELISA en la Figura 1C. Las células NB no expresaron CCL20 detectable en ninguna condición evaluada. Para examinar el requisito del contacto célula-célula entre los monocitos y las células NB para la inducción de CCL20 en los monocitos, las células NB se cultivaron con monocitos en los mismos pocillos o en los pocillos de doble cámara, separados por una membrana semipermeable de 400 nM. Los monocitos no pudieron producir CCL20 en ausencia de un contacto directo con las células NB (Figura 7C). Para determinar si la inducción de CCL20 en los monocitos que se observaron en el sistema experimental *in vitro* descrito se produce en el sitio del tumor en pacientes con NB, se realizó FACS en suspensiones celulares preparadas a partir de tumores de NB primarios recién resecados en el momento del diagnóstico. Todas las células monocíticas derivadas de tumores expresaron CCL20 mientras que las células tumorales y la mayoría de los leucocitos no monocíticos infiltrantes de tumores positivos a CD45 (TIL) fueron negativos (Figura 1E). Por lo tanto, los TAM en tumores primarios de NB producen CCL20, cuya expresión se induce selectivamente en células monocíticas tras el contacto directo con las células NB y aumenta por la hipoxia.

Ejemplo 3

25 Se requiere ccl20 para la migración de las células NKT hacia cultivos de nb/monocitos hipóxicos e injertos de NB en ratones HU-NSG

30 Se ha informado que CCL20 es una de las quimiocinas más potentes para las NKT humanas (Kim *y otros*, 2002; Thomas *y otros*, 2003). El análisis confirma que la mayoría de las NKT primarias de sangre periférica expresan CCR6, el único receptor para CCL20. Además, la expresión de CCR6 se conserva en las NKT expandidas *ex vivo* (Figura 8A). Para determinar el requisito del eje CCL20/CCR6 para la migración mejorada observada de las NKT hacia el cocultivo de células NB con monocitos en la hipoxia (Figura 1A), el estudio de migración *in vitro* se repitió en presencia de mAb neutralizantes de quimiocinas. De acuerdo con informes previos, el mAb anti-CCL2 inhibió eficazmente la migración de las células NKT a NB o a cocultivos de NB + monocitos bajo normoxia (Metelitsa *y otros*, 2004), pero no bajo hipoxia. Solo el mAb neutralizante anti-CCL20 inhibió fuertemente la migración de las células NKT en la hipoxia (Figura 2A).

40 Para examinar la contribución relativa de CCL2 y CCL20 al mecanismo de localización de la célula NKT en el sitio del tumor *in vivo*, los inventores adaptaron un modelo de NB humano CHLA-255/luc descrito previamente en ratones inmunodeficientes (Song *y otros*, 2009) y en lugar de ratones NOD/SCID, usaron hu-NSG (Figura 9A). Como se ha observado por otros (Yahata *y otros*, 2002; Giassi *y otros*, 2008), los ratones hu-NSG tuvieron una reconstitución estable de células mielomonocíticas humanas así como de linfocitos B y T tres meses después del trasplante con células madre hematopoyéticas positivas a CD34 de sangre de cordón umbilical humano (SCT, Figura 9B, C μ). Se inyectaron células CHLA-255/luc NB debajo de la cápsula renal tres meses y medio después de la SCT. Al igual que en los tejidos de NB humanos (Song *y otros*, 2009), los TAM representaron un subconjunto principal de leucocitos infiltrantes de tumores (Figura 9D, E) y se enriquecieron en un subconjunto con fenotipo M2 según se determinó por la regulación negativa de la expresión de HLA-DR en comparación con los monocitos de sangre periférica positivos a CD14 en los mismos ratones (Figura 9F). De manera importante, las células HLA-DR^{low} positivas a CD14 similares fueron el subconjunto dominante de TAM en tumores primarios de pacientes con NB (Figura 9G). Tres semanas después de la inyección de células NB y evidencia clara de crecimiento tumoral por imágenes bioluminiscentes, se inyectaron NKT humanas expandidas *ex vivo* a los ratones y se dividieron en grupos que recibieron mAb neutralizante anti CCL2 humano, anti CCL20 humano o mAb de control de isotipo. Un grupo de control no recibió NKT. El día 3 después de la transferencia de células NKT, se sacrificaron los ratones y se examinaron para detectar la localización de células NKT en los tejidos tumorales. Las Figuras 2B, C demuestran que los animales, tratados con mAb antiCCL2 o anti-CCL20, tenían menor frecuencia de NKT infiltrantes de tumores entre los leucocitos positivos a hCD45 infiltrantes de tumores en comparación con el grupo control de IgG (25,9 \pm 12,6 % o 44,9 \pm 6,3 % vs. 74,3 \pm 9,7 %, respectivamente, P < 0,01, ANOVA unidireccional). Si bien confirman el papel de la CCL2 derivada de NB que se estableció previamente, estos datos establecen el requisito de CCL20 para la localización de células NKT en el sitio del tumor a pesar de que esta última quimiocina no se produce por las células tumorales, sino que se induce en los TAM. Por lo tanto, las NKT se localizan eficazmente en tumores NB en ratones hu-NSG y migran hacia los TAM de una manera dependiente de CCL20.

Ejemplo 4

65 El MBTNFA en células NB induce la activación de NF-KB en monocitos que da como resultado la regulación positiva de CCL20

El requisito observado para un contacto célula-célula entre células NB y monocitos para la inducción de CCL20 en

monocitos y el requisito que se conoce de activación de NF- κ B para la expresión de CCL20 (Battaglia y *otros*, 2008) impulsó una búsqueda de moléculas de superficie celular candidatas en células NB con propiedades proinflamatorias. E. Goillot y *otros* observaron la expresión de la proteína TNF α en dos líneas celulares de NB por inmunohistoquímica (Goillot y *otros*, 1992). Los inventores han examinado 3 líneas celulares de NB amplificadas con MYCN (SK-N-BE2, IMR32, LA-N1) y 3 no amplificadas con MYCN (CHLA-255, CHLA-15, LA-N-2) por FACS y encontraron que la mayoría de las células en todas las líneas expresan TNF α intracelular (Figura 19) así como en la superficie celular como una citocina unida a la membrana (mb) (Figura 3A). No se detectó TNF α soluble por ELISA en los sobrenadantes de todas las líneas celulares que se examinaron. De manera importante, la presencia de un subconjunto positivo a mbTNF α en los siete tumores primarios NB que se examinaron con una frecuencia que oscila de 1,1 % a 38,2 % ($12,2 \pm 14$ %, Figura 3B). El nivel de expresión de MYCN no se correlacionó con la frecuencia de células positivas a mbTNF α ni en líneas celulares ni en tumores primarios. Los experimentos de bloqueo de función demostraron que una preincubación de las células NB con un mAb de bloqueo anti-TNF α inhibió significativamente su capacidad para inducir la producción de CCL20 en monocitos en condiciones normóxicas e hipóxicas ($P < 0,001$, Figura 3C). Ni la frecuencia de células positivas a TNF α ni el nivel de expresión de TNF α en las células NB se afectaron por la hipoxia. Para examinar el requisito de mbTNF α para la activación de la señalización de NF- κ B en monocitos, los monocitos se cultivaron solos (en placas no adherentes) o en la monocapa de células NB (los monocitos solo se adhieren libremente a la monocapa de células NB) en presencia de un control de isotipo o mAb de bloqueo anti-TNF α en condiciones normóxicas o hipóxicas. La figura 3D demuestra que I κ B α , un inhibidor de I κ B, se fosforila (un evento que se requiere aguas arriba en la activación de NF- κ B por estímulos extracelulares) en monocitos tras el contacto con las células NB y la fosforilación de I κ B α se evitó casi por completo en presencia de mAb de bloqueo anti-TNF α . La condición hipóxica mejoró la fosforilación de I κ B α y esto también se inhibió fuertemente por el mAb de bloqueo anti-TNF α . Dado que las células NB contaminantes no podían excluirse como fuente de fosfo-I κ B α en las preparaciones de monocitos descritas anteriormente, repetimos este experimento y realizamos un análisis por FACS intracelular de I κ B α y p65 fosforilada. Después de la activación de las células CD5610w (monocitos), hubo una disminución de la expresión de I κ B α (degradación tras la fosforilación) dentro de los 30 minutos posteriores al contacto con las células NB, y el efecto se anuló en presencia de mAb de bloqueo anti-TNF α (Figura 3E). De acuerdo con la disminución de la expresión de I κ B α , hubo un aumento de la expresión de fosfo-p65 en monocitos y esto se inhibió por el mAb de bloqueo anti-TNF α en condiciones normóxicas (Figura 3F) e hipóxicas. El cocultivo de monocitos con células NB bajo hipoxia dio como resultado niveles más altos y una expresión de p65 más sostenida en comparación con la normoxia (Figura 3G). Por lo tanto, el NB contiene un subconjunto de células tumorales proinflamatorias que expresan mbTNF α que no se conocía previamente, que al menos en parte se requiere para la inducción de la producción de CCL20 en los TAM *por medio de* la activación de la señalización de NF- κ B, que se estabiliza y mejora por hipoxia inducida por tumor.

Las células NKT se localizan preferentemente en áreas hipóxicas dentro de los tejidos tumorales. Para examinar la distribución relativa de las NKT en áreas hipóxicas y normóxicas del tumor, usamos un modelo metastásico de NB en ratones hu-NSG. En este modelo, se inyectaron células CHLA-255/luc por vía intravenosa para producir crecimiento metastásico en hígado y hueso/médula ósea (Figura 6A), que también son los principales sitios metastásicos en pacientes con NB (Seeger y *otros*, 1996). El día 21, se inyectaron NKT marcadas con CFSE a los ratones portadores de tumor y se examinó su localización en metástasis hepáticas 3 días después. Las áreas de hipoxia en los sitios primarios y metastásicos se visualizaron mediante el uso de la inyección intravital de EF5 seguida de la tinción con un mAb anti-EF5 conjugado con fluorocromo (Gacciabene y *otros*, 2011). Los mismos tejidos se tiñeron conjuntamente con mAb anti-CD11b de modo que la distribución tanto de las NKT como de las células mieloides en tejidos tumorales normóxicos e hipóxicos se analizó y se cuantificó mediante el uso de microscopía confocal de 4 colores. A diferencia de los tejidos hepáticos normales en ratones hu-NSG libres de tumor, en los que no se detectó tinción para hipoxia, los tejidos metastásicos contenían áreas normóxicas e hipóxicas, y se encontraron más del 90 % de las NKT y las células mielomonocíticas en este último. El análisis cuantitativo demostró que las frecuencias de células NKT y positivas a CD11b por 1000 células fueron $14,8 \pm 6,3$ y $20,8 \pm 8,9$ vs. $1,3 \pm 1,6$ y $1,1 \pm 1,2$ en áreas hipóxicas vs. normóxicas, respectivamente ($P < 0,001$). Por lo tanto, las NKT se localizan junto con los TAM en los tejidos tumorales hipóxicos.

Ejemplo 5

Las células NKT se inhiben por contacto con las células NB y la hipoxia

Dado que la muerte mediada por células NKT o la inhibición de los TAM es importante para su actividad antitumoral contra los tumores CD1d negativos (Song y *otros*, 2009), se consideró cómo el ambiente del tumor hipóxico, que al menos en parte es responsable del tráfico de las células NKT hacia los TAM, afecta su viabilidad y función. Las NKT expandidas a partir de PBMC de cuatro donantes mediante el uso de estimulación antigénica con aGalCer se cultivaron en condiciones normóxicas e hipóxicas durante 24 horas y se examinó la viabilidad de las células NKT mediante exclusión con azul de tripano a diferentes intervalos de tiempo. En ausencia de citocinas exógenas, la viabilidad de las células NKT se mantuvo durante 24 horas en normoxia, pero más del 50 % de las células murieron en hipoxia durante el mismo período. La Figura 4A demuestra que la IL-2 y otras citocinas que comparten la cadena gamma común (la IL-15, la IL-4, la IL-7), excepto la IL-21, mejoraron significativamente la supervivencia de las células NKT en la hipoxia ($P < 0,01$). Si bien ambas citocinas redujeron significativamente la tasa de apoptosis de las células NKT en normoxia, ni la IL-2 ni la IL-15 protegieron significativamente a las NKT de la apoptosis en condiciones de hipoxia ($P > 0,05$) como se midió mediante la tinción de Anexina-V/7-AAD (Figura 20), lo que sugiere que el efecto observado en el número absoluto de células viables se debió principalmente a la proliferación de células NKT soportada por citocinas, como se muestra para las NKT transducidas con la IL-15 en la Figura 6B y es consistente con el cambio metabólico de los linfocitos proliferantes a la glucólisis con

dependencia reducida del oxígeno (Roos y Loos, 1973; Krauss y otros, 2001; Frauwirth y otros, 2002; Jones y Thompson, 2007).

Para examinar el efecto de la hipoxia sobre la actividad funcional de las NKT, los inventores activaron el TCR de células NKT mediante la adición de mAb 6B11 agonista y midieron la producción de citocinas en los sobrenadantes celulares mediante ELISA. La figura 4B demuestra que después de 24 horas de exposición a la hipoxia, la producción de IFN γ por las NKT cayó a $31,9 \pm 6,1$ % y $25,7 \pm 2,7$ % de la cantidad producida en normoxia cuando las NKT se cultivaron solas o con células NB, respectivamente ($P < 0,001$). Para examinar el potencial de las citocinas de la familia IL-2R γ para proteger la función de las células NKT de la hipoxia, los inventores añadieron concentraciones saturantes de estas citocinas a los cultivos de células NKT. La IL-2 y la IL-15 pero no otras citocinas rescataron la respuesta del IFN γ de las NKT a la estimulación de TCR en ausencia o presencia de células NB. Por lo tanto, la quimioatracción mediada por CCL20 de las NKT hacia los TAM hipóxicos conduce a la inhibición de la actividad funcional de las células NKT y al escape tumoral del control de las células NKT que podría revertirse mediante la IL-2 o la IL-15, en ciertas modalidades de la invención.

Varios informes recientes demostraron que las NKT juegan un papel clave en la lesión por isquemia-reperfusion hepática y renal (Lappas y otros, 2006; Li y otros, 2007) y en la génesis de la crisis vasooclusiva en la enfermedad de las células falciformes (Wallace y otros, 2009; Wallace y Linden, 2010; Field y otros, 2011). La isquemia y la inflamación agudas en estas condiciones se han asociado con la producción espontánea de IFN γ por las NKT tanto en ratones como en humanos. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto directo de la hipoxia sobre la expresión de IFN γ en las NKT. Para examinar el efecto de la hipoxia en la producción espontánea de citocinas por las NKT humanas, cultivamos NKT quiescentes de cuatro donantes en condiciones normóxicas o hipóxicas durante diferentes intervalos de tiempo (2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas) y medimos la producción del IFN γ y la IL-4 por ELISA. En ausencia de estimulación antigénica, las citocinas permanecieron indetectables en normoxia o hipoxia en cualquier intervalo de tiempo examinado, lo que sugiere que la hipoxia no estimula directamente las NKT humanas.

Ejemplo 6

La IL-15 protege a las NKT y restaura su potencial antitumoral

La IL-15 desempeña un papel crítico en el desarrollo y el mantenimiento homeostático de las células NKT (30; 31). Los resultados de este estudio (Figura 4B) sugieren que la IL-15 también puede proteger a las NKT del efecto inhibitorio del microambiente tumoral hipóxico. Por lo tanto, en modalidades de la invención, la expresión transgénica de la IL-15 en las NKT transferidas adoptivamente aumentaría su potencial antitumoral debido a la persistencia y funcionalidad mejorada *in vivo* en el sitio del tumor. Las NKT se transdujeron con una construcción retroviral descrita anteriormente, que contenía ADNc de la IL-15 humana, el gen suicida de caspasa-9 inducible (iCasp-9), y la etiqueta CD34 (Hsu y otros, 2007) para crear las NKT/IL-15. La Figura 5A muestra que las NKT humanas expandidas *ex vivo* podrían transducirse de manera estable con el vector que contiene la IL-15. Producción de IL-15 por las NKT transducidas por ELISA. Para examinar el potencial protector de la IL-15 transgénica en la función de las células NKT en hipoxia y en presencia de células tumorales, se usaron ajustes similares *in vitro* como se describe en la Figura 4B y se midió la proliferación de células NKT inducida por TCR mediante el uso del ensayo de dilución CFSE. De acuerdo con las propiedades protectoras observadas de la hrIL-15 exógena, las NKT/IL-15 tuvieron una tasa de proliferación significativamente mayor tras la hipoxia sola y en presencia de células NB en comparación con las NKT parentales (Figura 5B, $P < 0,01$). El efecto antiapoptótico de la IL-15 transgénica fue significativo solo en condiciones normóxicas, al igual que el efecto antiapoptótico de la IL-15 exógena (Figura 20). El recuento absoluto de células al final del cultivo de 5 días demostró de manera concluyente que las NKT/IL-15 se expandieron significativamente mejor que las NKT en todas las condiciones evaluadas (Figura 6C). Por lo tanto, las NKT modificadas genéticamente para expresar IL-15 transgénica se protegen tras el reconocimiento antigénico en el microambiente tumoral hipóxico.

Ejemplo 7

Las NKT transducidas con IL-15 tienen actividad antitumoral potente en un modelo de NB metastático en ratones HU-NSG

Para examinar si las NKT/IL-15 tienen una ventaja terapéutica, se utilizó un modelo de NB metastático en ratones hu-NSG. Tres meses y medio después del SCT y tras la confirmación de la reconstitución hematopoyética humana (Figura 9B, C), los ratones se inyectaron *i/v* con células NB humanas transducidas con luciferasa, CHLA-255/luc. Los grupos terapéuticos también recibieron una inyección única de NKT o NKT/IL-15. Los ratones NSG que no recibieron células madre positivas a CD34 humanas se usaron como grupo control para evaluar el efecto general de las células hematopoyéticas humanas sobre el crecimiento tumoral. La Figura 6A demuestra que el crecimiento metastático en ratones hu-NSG mejoró drásticamente en comparación con los ratones NSG, lo que proporciona un soporte adicional para el papel destacado de las células derivadas de BM en el aumento del crecimiento del NB. La inmunoterapia con las NKT tuvo un efecto inhibitorio significativo pero de corta duración sobre el crecimiento metastático. Por el contrario, una sola inyección de NKT/IL-15 anuló completamente el efecto promotor del tumor del ambiente hematopoyético humano (Figura 6A, B). Para determinar si la actividad antitumoral mejorada de las NKT/IL-15 permanece restringida a CD1d, los inventores repitieron el tratamiento de las metástasis de NB en ratones hu-NSG con las NKT/IL-15 después del pretratamiento con mAb de bloqueo anti-CD1d o control de isotipo. La Figura 6C demuestra que la eficacia antitumoral de

las NKT/IL-15 se inhibió por el mAb anti-CD1d ($P < 0,05$), lo que indica que el efecto de la IL-15 depende al menos en parte de la función de las NKT restringidas a CD1d aunque, debido a la inhibición incompleta, no puede excluirse una contribución de los efectos independientes de NKT de la IL-15, como la activación de células NK. Estos datos indican que la inmunoterapia con las NKT/IL-15 puede ser efectiva en pacientes con NB metastásico y otros tipos de cáncer. Esta forma novedosa de inmunoterapia dirigida al estroma de soporte tumoral puede combinarse con otras formas de inmunoterapia o quimioterapia que se dirigen directamente a las células tumorales, en ciertas modalidades de la invención.

Ejemplo 8

10 Importancia de ciertas modalidades

El objeto en la presente descripción revela un mecanismo novedoso de escape tumoral del control inmunitario por las NKT y proporciona una visión mecanística del desarrollo de la inmunoterapia contra el cáncer que se basa en células NKT. Debido a que la actividad antitumoral de las células NKT contra los tumores negativos a CD1d depende de su capacidad documentada para colocalizarse e interactuar con los TAM positivos a CD1d (Song y otros, 2009), el esclarecimiento del mecanismo por el cual el tráfico de las NKT hacia los TAM y la comprensión del efecto de este proceso sobre la función de las células NKT son útiles para el diseño racional de la inmunoterapia que se basa en células NKT. Además del requisito descrito previamente para CCL-2 derivado de células NB (Metelitsa y otros, 2004), la migración de células NKT al sitio del tumor depende de CCL20, que es producida por los TAM dentro de los tejidos tumorales. La expresión de CCL20 se induce en células monocíticas tras el contacto con células NB y al menos en parte depende del mbTNF α , que se expresa en la superficie de las células NB. Además, la expresión de CCL20 inducida por células NB en células monocíticas se amplifica en gran medida por la hipoxia, que se conoce que atrae a los TAM (Mantovani y otros, 2008; Allavena y otros, 2008; Mantovani y otros, 2006). Esto indica que un gradiente de CCL-20 dirige el tráfico de células NKT hacia los tejidos tumorales hipóxicos. De hecho, más del 90 % de las NKT infiltrantes de tumores se localizan junto con macrófagos en áreas hipóxicas de xenoinjertos de NB en ratones hu-NSG. La hipoxia a su vez inhibe la capacidad de las células NKT de responder a una estimulación antigénica que explica cómo los tumores en crecimiento pueden neutralizar la función de las células NKT y rescatar a los TAM que soportan el tumor del ataque de las células NKT. De manera importante, la IL15 protege a las NKT activadas por antígeno de la hipoxia y las NKT/IL-15 tienen una actividad antitumoral potente y duradera en un modelo hu-NSG de NB metastásico.

Los TAM en tumores primarios de NB producen CCL20, cuya expresión se induce selectivamente en células monocíticas tras el contacto directo con las células NB y aumenta por hipoxia. De interés, existe un requisito diferencial para CCL2 y CCL20 para la migración de células NKT *in vitro* hacia un cocultivo de células NB con monocitos en condiciones normóxicas e hipóxicas. Si bien se requirió CCL2 para la migración de células NKT en normoxia, CCL20 fue en gran parte responsable de su migración en la hipoxia. La regulación negativa observada de la expresión de CCL2 en células NB en hipoxia combinada con la inducción de CCL20 en monocitos hipóxicos sugiere un modo de migración de células NKT en dos etapas en los tejidos tumorales: Salida mediada por CCR2 o CCR4 de la circulación hacia células NB productoras de CCL2 en las áreas oxigenadas alrededor de los vasos sanguíneos y después tráfico mediado por CCR6 hacia los TAM productores de CCL20 en las áreas hipóxicas. Los experimentos de bloqueo con mAb neutralizante anti-CCL20 *in vivo* respaldan adicionalmente la importancia de CCL20 para la localización de las células NKT en el sitio del tumor. Por lo tanto, en las modalidades de la invención, las NKT se localizan junto con los TAM como parte de una respuesta innata novedosa a la hipoxia inducida por tumores. Dicha respuesta podría permitir el reconocimiento específico mediado por células NKT de los TAM en las primeras etapas de progresión tumoral cuando los TAM desempeñan un papel importante en la vascularización tumoral y la supervivencia de las células tumorales (Mantovani y otros, 2008; Sica y otros, 2008; Sica y Bronte, 2007; Pietras y otros, 2009). Además, este mecanismo es parte de un papel conservador evolutivo de las NKT en la regulación negativa de la inflamación crónica, en ciertas modalidades, y explica las capacidades paradójicas de estas células para controlar la autoinmunidad mientras promueven la inmunidad tumoral, en modalidades específicas. Sin embargo, el tumor en crecimiento también puede usar el mismo fenómeno para el escape inmunitario tras atrapar las NKT en los tejidos hipóxicos e impedir su función. Es probable que estos dos procesos con efectos opuestos sobre el crecimiento tumoral ocurran al mismo tiempo, y el equilibrio entre ellos puede determinar el resultado de la enfermedad, en modalidades particulares. Los inventores buscaron la señal inflamatoria iniciadora que desencadena la inducción de la expresión de CCL20 en monocitos tras ponerse en contacto con las células tumorales. Se ha identificado una expresión abundante de mbTNF α en la superficie celular en todas las líneas celulares de NB que se evaluaron, independientemente de su estado MYCN y la existencia de un subgrupo de células NB positivas a mbTNF α en tumores primarios, que no se conocía previamente. En la presente descripción se demuestra por primera vez que las células NB tienen propiedades proinflamatorias potentes, ya que, de forma dependiente de TNF α , activan la vía de señalización de NF-kB en células monocíticas que no solo da como resultado la expresión de CCL20, sino también la activación de un programa definido de expresión génica, que se conoce que es un sello distintivo de la inflamación crónica promotora de tumores (Pikarsky y otros, 2004; Greten y otros, 2004). Por ejemplo, NF-kB activa la expresión del gen de IL-6 en las células monocíticas, un factor de crecimiento que se conoce para las células NB no amplificadas por MYCN, y el nivel de expresión del ARNm de IL-6 se correlaciona negativamente con la supervivencia libre de enfermedad a largo plazo en los pacientes de riesgo de NB alto (Song y otros, 2009). La función promotora de tumores del eje TNF α -NF-kB está bien descrita en tumores epiteliales tanto en modelos de cáncer de ratón como en pacientes con cáncer (Grivennikov y otros, 2010; Greten y otros, 2004; Szlosarek y otros, 2006; Affara y Coussens, 2007). Estos son tumores comunes en adultos que frecuentemente pueden vincularse etiológicamente o patogenéticamente a las condiciones inflamatorias crónicas preexistentes como la hepatitis (Pikarsky y otros, 2004) o la colitis (Greten y otros, 2004). En contraste, el NB, así como otros tumores pediátricos, surgen

5 durante la embriogénesis o el desarrollo postnatal temprano en ausencia de una inflamación crónica preexistente (Maris y otros, 2007). La identificación de un subconjunto de células NB en tumores primarios con niveles altos de mbTNF α indica que estas células inician la inflamación de soporte tumoral y son útiles para modificarse con la terapia con antagonistas de TNF α , como las que se evalúan actualmente en ensayos clínicos en adultos con cánceres epiteliales y neoplasias hematológicas (Szlosarek y Balkwill, 2003; Brown y otros, 2008; Friedberg y otros, 2008), por ejemplo.

10 La viabilidad y función de las células NKT se afectan por la hipoxia, pero podrían protegerse por la IL-2 o la IL-15. Los estudios en ratones han demostrado que el desarrollo y el mantenimiento homeostático de células NKT dependen en gran medida de la IL-15 (Matsuda y otros, 2002). La IL-15 también estimula la proliferación y mejora la supervivencia de las NKT humanas (Baev y otros, 2004). Las NKT humanas negativas a CD4 (principalmente negativas doblemente a CD8/CD4, DN) expresan niveles mucho más altos de IL-2R α que el subconjunto positivo a CD4, de modo que la IL-15 expande preferentemente las NKT DN (Baev y otros, 2004). De manera importante, las NKT DN son más citotóxicas que las NKT positivas a CD4, y un informe reciente demostró que solo se requieren NKT DN para las respuestas antitumorales *in vivo* (Crowe y otros, 2005). Esto sugiere que la expresión de la IL-15 en NKT para fines terapéuticos apoyaría la expansión, persistencia y actividad antitumoral de NKT DN en pacientes con cáncer. La transducción de las NKT con ADNc de IL-15 los protege de los efectos inhibitorios de las células NB y la hipoxia. De manera importante, la NKT/IL-15 demostró una potente actividad terapéutica contra metástasis de NB en ratones hu-NSG. Además de actuar directamente sobre las NKT y mejorar su actividad contra los TAM, se espera que la IL-15 producida localmente active otras células efectoras inmunitarias antitumorales, como las células NK y T CD8 específicas del tumor (Walkdmann, 2006). Para garantizar la seguridad del posible uso clínico de las NKT/IL-15, se incorporó un gen suicida, iCasp-9, que permite la eliminación de las células transgénicas tras su activación farmacológica con un fármaco molecular pequeño no tóxico, AP20187 (Straathof y otros, 2005; Tey y otros, 2007; Quintarelli y otros, 2007). Las células T que expresan la molécula iCasp-9 se eliminan eficazmente tras la activación farmacológica del gen suicida *in vitro* e *in vivo* (Tey y otros, 2007; Quintarelli y otros, 2007), no solo en un modelo de ratón sino también en pacientes con linfoma. Por lo tanto, se espera que la terapia con NKT/IL-15 bajo el control de iCasp-9 sea segura y debe evaluarse en pacientes con NB recurrente/resistente.

30 El mecanismo por el cual las NKT son atraídas hacia los TAM en los tejidos tumorales se identifica en la presente descripción. En modalidades de la invención, este mecanismo refleja un papel más amplio de las NKT en la regulación de la inflamación y se aplica no solo en el contexto de la inflamación asociada al tumor, sino también en enfermedades infecciosas y autoinmunes crónicas, por ejemplo. La posibilidad de la localización tumoral y la actividad funcional de las células NKT en el sitio del tumor *por medio* de la modulación farmacológica y/o la modificación genética de las NKT, como se demuestra en la presente descripción, conduce al desarrollo de una inmunoterapia del cáncer eficaz y ampliamente aplicable.

35 Ejemplo 9

Materiales y métodos ilustrativos

40 Muestras humanas. Se obtuvieron siete muestras de NB primarios de biopsias procedentes de cirugías en el momento del diagnóstico en Texas Childrens Cancer Center, Baylor College of Medicine, de acuerdo con los protocolos H-26691 y H-6650 aprobados por el IRB. Para el análisis por FACS, los tejidos se homogeneizaron y se digirieron con dispasa II (Roche), colagenasa (Sigma) y DNasa I en suspensiones de células individuales. Los tejidos restantes se embebieron en OCT y se mantuvieron a -80 °C. La sangre del cordón umbilical se obtuvo de un banco de sangre del cordón umbilical en MD Anderson Cancer Center bajo el protocolo H-20911 aprobado por IRB. Se obtuvo el consentimiento informado de acuerdo con las políticas y procedimientos de la junta de revisión institucional para la investigación que trata sobre muestras humanas.

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

55 Producción de plásmidos y retrovirus. Dos vectores retrovirales SFG, SFG.iCasp-9.2A.6.C034.2A.IL-15 y SFG.eGFP.FFluc, se construyeron como se describió previamente (32) y se usaron para transducir las NKT. Para producir los sobrenadantes retrovirales, 293 células T se transfectaron junto con 3 plásmidos (que codifica Peg-Pam-e para gag-pol, que codifica ORF para la envoltura viral ROF114 y la construcción retroviral) mediante el uso del reactivo de transfección Genejuice (Merck KGaA) y se recogieron los sobrenadantes virales 48 y 72 horas después.

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

65

Tabla 1 Cebadores ilustrativos de PCR en tiempo real

Gen	Secuencia del cebador directo (5'-3')	Secuencia del cebador inverso (5'-3')	Longitud
5 LAPTM5	GGTCACACCTCTGAGTATG (sec. con núm. de ident.: 1)	GTGGAGGAGAAGAGAACTC (sec. con núm. de ident.: 13)	128 pb
CCL3	TGGCTGCTCGTCTCAAAGTA (sec. con núm. de ident.: 2)	TGCAACCAGTTCTCTGCATC (sec. con núm. de ident.: 14)	116 pb
10 CCL20	CGTGTGAAGCCCACAATAAA (sec. con núm. de ident.: 3)	GCTGCTTTGATGTCAGTGCT (sec. con núm. de ident.: 15)	122 pb
CXCL12A	CAGAGCTGGGCTCCTACTGT (sec. con núm. de ident.: 4)	GCATTGACCCGAAGCTAAAG (sec. con núm. de ident.: 16)	117 pb
15 CXCL10	GCAGGTACAGCGTACGGTTC (sec. con núm. de ident.: 5)	CAGCAGAGGAACCTCCAGTC (sec. con núm. de ident.: 17)	124 pb
CCL17	TGGAGCAGTCCTCAGATGTC (sec. con núm. de ident.: 6)	CTTCTCTGCAGCACATCCAC (sec. con núm. de ident.: 18)	129 pb
20 CCL19	CATCATTGGTGCCACTCAGA (sec. con núm. de ident.: 7)	ACACAGATCCTGCACACACC (sec. con núm. de ident.: 19)	148 pb
CXCL11	ATGCAAAGACAGCGTCTCT (sec. con núm. de ident.: 8)	CAAACATGAGTGTGAAGGGC (sec. con núm. de ident.: 20)	103 pb
25 CXCL16	CAATCCCCGAGTAAGCATGT (sec. con núm. de ident.: 9)	CTACACGAGGTTCCAGCTCC (sec. con núm. de ident.: 21)	119 pb
CCL5	TGTACTCCCGAACCCATTTC (sec. con núm. de ident.: 10)	TACACCAGTGGCAAGTGCTC (sec. con núm. de ident.: 22)	100 pb
CCL4	GGATTCACTGGGATCAGCAC (sec. con núm. de ident.: 11)	CTTCCTCGCAACTTTGTGGT (sec. con núm. de ident.: 23)	114 pb
35 CCL2	AGGTGACTGGGGCATTGAT (sec. con núm. de ident.: 12)	GCCTCCAGCATGAAAGTCTC (sec. con núm. de ident.: 24)	109 pb

El cambio relativo en la expresión génica se calculó en base al método ACt mediante el uso del gen de mantenimiento LAPTM5 (proteína 5 transmembrana asociada a lisosomas) como control.

Expansión, cultivo y transducción de células NKT. Las líneas celulares de NKT se expandieron a partir de PBMC de voluntarios sanos como se describió previamente con modificaciones (Metelitsa y otros, 2004). Brevemente, las PBMC se aislaron de las capas leucocitarias por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Las NKT se purificaron mediante microperlas anti-iNKT (Miltenyi Biotec). La fracción PBMC negativa se irradió (4000 Rad) y se dividió en alícuotas. Las NKT se estimularon con una alícuota de PBMC autólogas pulsadas con α -galactosilceramida (100 ng/ml, Funakoshi Co.Ltd). Se añadió rhIL-2 (200 U/ml, BOP, Instituto Nacional del Cáncer Frederick) al segundo día y después cada dos días. Las NKT se reestimularon cada dos semanas con las alícuotas restantes de PBMC. El fenotipo y la pureza de las NKT se evaluaron mediante el uso de mAbs para CD3, Va24-Ja18 (6B11), y CD4. Las NKT proliferantes se transdujeron con sobrenadantes retrovirales el día 5 después de la reestimulación en placas de 24 pocillos no tratadas con cultivo, previamente recubiertas con un fragmento de fibronectina recombinante (FN CH-296; Retronectina, Takara Shuzo). La tasa de transducción de las células NKT se midió mediante FACS con mAb anti-CD34-PE. Las NKT transducidas continuaron su expansión en presencia de rhIL-2.

Las NKT en reposo (7-10 días después de la reestimulación) se cultivaron en condiciones normóxicas (20 % de O₂) o hipóxicas (1 % de O₂ en una incubadora de tres gases Hearcell 240i, Thermo Scientific) durante 24 o 48 horas en ausencia o presencia de una de las siguientes citocinas: la rhIL-2 (NIH), la IL-15, la IL-4, la IL-7 (10 ng/ml cada uno, Peprotech) o la IL-21 (eBiosciences) a 200 U/ml cada una. El número absoluto de células viables se cuantificó mediante el uso del método de exclusión de azul de tripano.

Aislamiento de monocitos, experimentos de cocultivo. Las PBMC se aislaron por centrifugación en gradiente a partir de capas leucocitarias adquiridas de Gulf Coast Regional Blood Center (Houston, TX). Los monocitos se aislaron por selección negativa mediante el uso de Monocyte Isolation kit II (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En los experimentos de cocultivo, se añadieron monocitos directamente a las células de neuroblastoma o a los insertos separados por una membrana de 0,4 μ m (Costar Corning) de las células de neuroblastoma. Donde se indicó, las células de neuroblastoma se preincubaron con anticuerpo neutralizante TNF α (1825, R&D Systems) o control de isotipo IgG1 (11711, R&D Systems) durante 1 hora antes del cocultivo con monocitos. Las células se cultivaron en condiciones

hipóxicas (1 % de O₂ o normóxicas (20 % de O₂) y se recogieron los sobrenadantes en los puntos de tiempo indicados.

5 Ensayo de cuantificación de citocinas Multiplex y ELISA. Las citocinas liberadas por las NKT se evaluaron mediante cuentas CBAPlex (BD Biosciences) en el analizador FACSArray de acuerdo con el manual del fabricante y como se describió anteriormente (Metelitsa y otros, 2004). La CCL20 en los sobrenadantes de cocultivo se determinó mediante el uso de Human CCL20/MIP-3 alpha Quantikine ELISA Kit (R&D Systems).

10 *Ensayo de migración in vitro.* La migración de la célula NKT *in vitro* se evaluó mediante el uso de insertos Transwell permeables (5 µm, Corning Costar). Cuando se indicó, los sobrenadantes de los monocitos y las células NB en las cámaras inferiores se preincubaron con control de isotipo (clon 11711) o anticuerpo neutralizante contra CCL20 (67310) o CCL2 (24822) (R&D Systems) durante 1 hora antes de adicionar las NKT en las cámaras superiores. El análisis cuantitativo de la migración de las células NKT se realizó por FACS como se describió previamente (Song y otros, 2007).

15 Citometría de flujo (FACS). Para analizar la expresión de CCL20 en los monocitos, las células se incubaron primero con GolgiStop (BO Biosciences) durante 4 horas y después se tiñeron con los siguientes marcadores de superficie: CD56-APC, CD14APC, Cy7, CD33-PE.Cy7 y CD45-PerCP (BO Biosciences). Las células se fijaron y se permeabilizaron con un kit Perm/Fix (BO Biosciences) y se tiñeron intracelularmente con CCL20-PE (BO Biosciences). Para determinar el nivel de expresión de CCR6 en las NKT, las células se tiñeron superficialmente con CD3-APC, 6B11-FITC, CD4-(PE.Cy7) y CCR6-PE (BO Biosciences).

20 Para monitorear el desarrollo de la hematopoyesis humana en ratones hu-NSG, se utilizó el siguiente conjunto de mAb: anti CD45 humano-FITC, anti CD45 de ratón-PerCP, CD14-PE, CD33-PE.Cy7, CD3-APC (BO Biosciences) y CD20APC.Cy7 (Biolegend). Para determinar la pureza de las células madre positivas a CD34 humanas, los inventores usaron CD45-PerCP, CD3APC y CD34-PE (BO Biosciences). Para analizar los leucocitos humanos que se infiltran en neuroblastomas primarios o xenoinjertos tumorales en ratones hu-NSG: CD45-PerCP, CD3-APC, 6B11-FITC, CD14-APC.Cy7, HLADR-PE.Cy7, CD1d PE (BO Biosciences). Además, los neuroblastomas primarios se analizaron para la expresión de marcadores de superficie mediante el uso de mAbs: CD45-PerCP, CD56-APC (BO Biosciences) y TNFα-FITC (R&D Systems).

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

30 Los niveles de expresión de IκBα y NF-κB p65 fosforilado se determinaron por FACS en monocitos de acuerdo con los protocolos del fabricante (BD PhosFlow). Brevemente, se cultivaron 1-2 x 10⁶ ml⁻¹ monocitos con/sin la línea celular de neuroblastoma CHLA-255 (~ 70-80 % de confluencia) en presencia de un TNFα neutralizante o control de isotipo adecuado para puntos de tiempo especificados. Después de la incubación, las células se fijaron inmediatamente tras adicionar un volumen igual de tampón de fijación BD PhosFlow Cytotfix precalentado a 37 °C; las placas se incubaron durante 10 minutos adicionales a 37 °C y después se cultivaron las células. Para la permeabilización, BD Phosflow Perm Buffer IV, preenfriado a -20 °C, se añadió gota a gota al sedimento celular y se incubó durante 15-20 minutos adicionales a temperatura ambiente. Los tubos se almacenaron a -20 °C hasta que se tiñeron con el mAb anti-NFκB p65 fosfoespecífico Alexa Fluor 488 (o premarcado con IκBα) y PE o el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD56 marcado con APC para identificar el NB y los monocitos en cocultivo.

35 El análisis se realizó en un citómetro de flujo LSR-II de cuatro láser (BD Biosciences) mediante el uso del programa BD FACSDiva v. 6.0 y FlowJo 7.2.5 (Tree Star, Inc).

40 *Experimentos in vivo.* Se criaron ratones NOD/SCID/IL2rgamma(nulo) (NSG) en la instalación de animales TCH. Los ratones de cuatro semanas de edad se irradiaron con 225 cGy y se inyectaron con células madre positivas a CD34 derivadas de sangre del cordón umbilical humano como se describió previamente (Yahata y otros, 2002; Giassi y otros, 2008). La frecuencia de las células positivas a CD34 fue > 95 % y la contaminación por las células positivas a CD3 fue menor que 0,1 % en los trasplantes de células madre. Tres meses después de la SCT, se confirmó la reconstitución de la hematopoyesis humana en sangre periférica por FACS y los ratones se inyectaron i/v con células CHLA255/luc humanas, ya sea debajo de la cápsula renal (experimentos de localización) como se describió previamente (Kim y otros, 2002) o por vía intravenosa (experimentos terapéuticos). El crecimiento tumoral se evaluó indirectamente mediante imágenes bioluminiscentes semanalmente (Small Animal Imaging Core facility, TCH). Cuando se indicó, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 100 Ilg/ratón de mAb anti-CCL2 neutralizante (24822), anti-CCL20 (67310), o control de isotipo (11711) (R&D Systems). Algunos animales recibieron inyecciones intravenosas de NKT humanas expandidas *ex vivo* (1-5 X 10⁷ células). Antes de la inyección en animales, las NKT se cultivaron con IL-2, 50 U/ml (Peprotech) durante 7-10 días sin estimulación con TCR para lograr la fase de reposo cuando su patrón de tráfico se parecía más al de las NKT primarias, como determinamos previamente (Metelitsa y otros, 2008). Los ratones se sacrificaron después de 72 horas, y las suspensiones celulares preparadas a partir de los tumores se analizaron mediante citometría de flujo multicolor como se describe en la sección "Citometría de flujo". Cuando se indica, la eficacia antitumoral de las células NKT se determinó mediante imágenes bioluminiscentes. Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por IACUC.

Análisis estadísticos. En los experimentos *in vitro* e *in vivo*, las comparaciones entre grupos se basaron en la prueba t de Student de dos lados no pareados o ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Tukey-Kramer de comparación de medias grupales. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism™ 5.0 (GraphPad Software).

Ejemplo 10

Reconocimiento específico de neuroblastos y macrófagos de soporte de neuroblastos con células NKT de doble especificidad

Introducción. La infiltración de tumores primarios con células T asesinas naturales (NKT) invariantes de Va24 se asocia con un buen resultado en el neuroblastoma y otros tipos de cáncer. Los estudios mecanísticos revelaron que, en lugar de atacar a las células tumorales directamente, las células NKT se dirigen a los macrófagos asociados a tumores (TAM) positivos a CD1d. Sin embargo, el control inmunitario eficaz del tumor también puede requerir un ataque directo y específico contra las células tumorales.

Métodos. *Las células NKT humanas propagadas ex vivo* se modificaron genéticamente mediante el uso de un vector retroviral que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se dirige al gangliósido GD2 que es altamente expresado por las células de neuroblastoma y representa un objetivo terapéutico clínicamente validado. La actividad funcional del TCR nativo y CAR.GD2 en las células NKT modificadas por genes se evaluó mediante el uso de TAM positivos a CD1d y células de neuroblastoma positivas a GD2, respectivamente. A continuación, codificamos endodominios coestimuladores *en cis* con CAR.GD2 (CD28, CD134, CD137 y sus combinaciones) para permitir una señalización óptima mediada por CAR para la citotoxicidad, la producción de citocinas, la proliferación, y la supervivencia de las células NKT.

Resultados. La expresión de construcciones CAR.GD2 hizo que las células NKT fueran altamente citotóxicas contra las células de neuroblastoma positivas a GD2, mientras que su citotoxicidad restringida a CD1d nativa no se afectó. Solo las células CAR.GD2 NKT que expresaron los endodominios coestimuladores de CD28, CD134 y/o CD137 experimentaron una proliferación rápida tras una estimulación específica suficiente para permitir la expansión a escala clínica de las células NKT modificadas genéticamente. Mientras que la transferencia adoptiva de las células NKT parentales solo suprimió transitoriamente el crecimiento del neuroblastoma metastásico en ratones NOD/SCID/IL-2y(nulo) humanizados, las células NKT que expresan CAR.GD2 con endodominios CD28 o CD137 tenían una actividad antimetastásica potente y duradera. Además, hubo una polarización sorprendente y no anticipada previamente similar a Th2 (IL-4 e IL-10) y similar a Th1 (IFN γ y GM-CSF) de las células NKT que expresan CAR.GD2/CD28 y CAR.GD2/CD137, respectivamente.

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

Ejemplo 11

Modalidades particulares de la invención

La invención proporciona una inmunoterapia eficaz contra el cáncer mediante el uso de propiedades naturales y modificadas genéticamente de las NKT para modificar tanto a las células estromales que soportan el tumor como a las propias células tumorales.

La importancia de las NKT para la inmunidad antitumoral y la inmunoterapia se ha demostrado en múltiples modelos de cáncer (Swann y otros, 2007; Dhodapkar, 2009; Song y otros, 2007). La infiltración de células NKT de tumores primarios se asoció con un buen resultado en niños con NB (Metelitsa y otros, 2004), un hallazgo que desde entonces se ha extendido por otros investigadores a tumores malignos en adultos (Tachibana y otros, 2005; Molling y otros, 2007). Hallazgos recientes indican que, en lugar de atacar directamente a las células tumorales, las NKT se dirigen a los TAM positivos a CD1d, que proporcionan un soporte estromal esencial para las células tumorales (Song y otros, 2009; De Santo y otros, 2008). Sin embargo, además de atacar el estroma tumoral, el control inmunitario eficaz del tumor también puede requerir un ataque directo y específico contra las células tumorales. La infusión de EBV-CTL injertados con un CAR que se dirige al antígeno GD2 expresado por los neuroblastos (CAR.GD2) proporciona respuestas tumorales objetivas en pacientes con NB refractario/recidivante (Pule y otros, 2008; Louis y otros, 2011). En modalidades de la invención, las NKT modificadas genéticamente con CAR.GD2 tienen eficacia antitumoral en NB *por medio del* reconocimiento específico de los TAM que soportan los neuroblastos y de los propios neuroblastos.

El conocimiento acumulado de la biología de las células NKT humanas sugiere que, al igual que con otras células T (Maher y otros, 2002; Portero y otros, 2011), el potencial terapéutico de las NKT que expresan CAR podría incrementarse

tras proporcionar señales coestimuladoras óptimas. Para caracterizar adicionalmente esto, los inventores generaron construcciones de CAR.GD2 con endodominios coestimuladores ilustrativos: CD28, OX40 y/o CD137. Además, la IL-15 protege a las NKT de la hipoxia inducida por tumores y se demostró que la expresión transgénica de la IL-15 en las NKT mejora drásticamente su actividad antimetastásica (Liu y otros, 2012). Con este conocimiento, los inventores generaron nuevas construcciones CAR.GD2 que codifican tanto los endodominios coestimuladores como la IL-15 (vectores bicistrónicos). Para garantizar la seguridad y la aplicabilidad clínica de la modificación génica, previamente también generamos vectores tricistrónicos en los que CAR e IL-15 se acoplaron con la expresión de la caspasa-9 inducible (iCasp-9), que se activa por un fármaco no tóxico CID AP1903 (Quintarelli y otros, 2007; Hoyos y otros, 2010), lo que forma un cambio suicida que se ha encontrado que es seguro y altamente eficaz en un ensayo clínico reciente de fase I (Di y otros, 2011).

Lo siguiente expone ciertas modalidades de la invención.

Se produce la expresión de CAR.GD2 en las NKT y se evalúa su citotoxicidad *in vitro* contra células NB y la actividad antitumoral *in vivo* contra xenoinjertos de NB en ratones hu-NSG. Las células NKT aisladas de pacientes con NB se expanden *ex vivo* y se transducen con la construcción retroviral CAR.GD2. Las NKT positivas a CAR.GD2 se evalúan *in vitro* para su citotoxicidad contra líneas celulares de NB positivas a GD2 y por su citotoxicidad nativa contra células positivas a CD1d. Los estudios *in vivo* de NKT positivas a CAR.GD2 transferidas de forma adoptiva evalúan su persistencia, localización tumoral y eficacia antitumoral mediante el uso de modelos de NB establecidos en ratones hu-NSG.

Está presente la expresión de CAR.GD2 con endodominios coestimuladores en las NKT y se caracteriza su persistencia y actividad antitumoral *in vivo*. Las NKT se transducen con construcciones CAR.GD2 modificadas genéticamente con porciones coestimuladoras que se conoce que proporcionan señales coestimuladoras importantes para las NKT: CD28, 4-1BB, CD28/CD137, o CD28/OX40. Los experimentos *in vitro* seleccionan aquellas construcciones que, en respuesta a la estimulación GD2, soportan la proliferación celular de NKT y la respuesta de citocinas sesgadas por Th1 superiores, mientras mantienen intacta la especificidad de TCR nativa y la capacidad de matar los TAM de las NKT. Las NKT modificadas con estas construcciones seleccionadas se evalúan después para la expansión, persistencia y mayor eficacia antitumoral *in vivo* en los modelos hu-NSG de NB.

Está presente la expresión de CAR.GD2/IL-15 en las NKT y se caracteriza su persistencia y actividad antitumoral *in vivo*. CAR.GD2/IL-15 se expresa en las NKT mediante el uso de un vector tricistrónico que codifica a CAR.GD2 con un endodominio coestimulador, IL-15 e iCasp9. Las NKT de CAR.GD2/IL-15 se evaluarán por la capacidad de soportar *in vivo* la expansión, la persistencia a largo plazo y la mayor eficacia antitumoral de las células NKT en los modelos hu-NSG de NB. El tratamiento con AP1903 se usará para evaluar la eficacia del cambio suicida iCasp-9 para la eliminación de NKT modificadas genéticamente.

Está presente la producción de un vector retroviral de grado GMP y la validación de su actividad mediante el uso de las NKT de pacientes con NB. Una vez que se selecciona la construcción, se puede generar una línea celular productora retroviral estable y está presente la producción de un stock del vector de grado clínico que se usa para transducir las NKT derivadas de pacientes, cuyas propiedades funcionales y actividad antitumoral se validan en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Las modalidades específicas son las siguientes: 1) evaluación del papel del eje CCL20/CCR6 en el mecanismo de localización de células NKT en los tejidos tumorales hipóxicos; 2) expresión de mbIL-7-ODDD en NKT humanas para mejorar la supervivencia en la hipoxia y para evaluar el potencial antitumoral de mbIL-7-NKT contra xenoinjertos de neuroblastoma humano en ratones NOD/SCID; evaluación del potencial terapéutico antitumoral de la inmunoterapia combinada con las NKT o NKT mbIL-7 y células T-CAR ant-GD2.

Como se demuestra al menos en las Figuras 10-13, un subconjunto de células que no se conocían previamente en líneas celulares de NB y tumores primarios expresan TNF α unido a membrana (mb). Estas células tumorales proinflamatorias indujeron la producción de la quimiocina CCL20 a partir de los TAM *por medio de* la activación de la vía de señalización NF-kB, un efecto que se amplificó en la hipoxia. Los análisis de citometría de flujo de tumores primarios humanos NB revelaron una acumulación selectiva de CCL20 en los TAM. La neutralización de la quimiocina inhibió *in vitro* la migración de las NKT hacia monocitos hipóxicos condicionados por el tumor y la localización de las NKT en injertos de NB en ratones. La hipoxia deteriora la viabilidad y función de las células NKT. Por lo tanto, el tráfico de células NKT hacia los TAM que producen CCL20 sirvió como una trampa hipóxica para las NKT infiltrantes de tumores.

Debido a que la expresión de mbIL-7-ODDD en las NKT no pudo rescatarlas del efecto inhibitorio de la hipoxia, como una aproximación alternativa, los inventores evaluaron otras citocinas que comparten una cadena gamma común. La IL-2 y la IL-15 protegieron a las NKT activadas por antígeno de la hipoxia. Además, la expresión transgénica de la IL-15 en las NKT transferidas adoptivamente aumentó drásticamente su actividad antimetastásica en ratones. Por lo tanto, la producción de quimiocinas inducida por tumores en TAM hipóxicos y la consiguiente quimioatracción e inhibición de las NKT representa un mecanismo de escape inmunitario que puede revertirse mediante inmunoterapia adoptiva con NKT transducidas con la IL-15.

Nuevos modelos. Para estudiar el potencial terapéutico de las NKT, los inventores han desarrollado modelos novedosos

de NB ortotópico y metastásico en ratones hu-NSG que se reconstituyen con células madre hematopoyéticas positivas a CD34 humanas. Estos modelos únicos son de gran relevancia clínica porque permiten por primera vez estudiar la localización tumoral de las NKT humanas u otras células efectoras inmunitarias y su interacción no solo con las células NB humanas sino también con las células estromales humanas (*por ejemplo*, los TAM) de origen hematopoyético en los tejidos tumorales.

La presente invención proporciona un concepto novedoso de inmunoterapia en el que las células tumorales y las células estromales de soporte tumoral se modifican simultáneamente para lograr la máxima eficacia terapéutica. En esta etapa, los inventores usan las NKT o la IL-15 de NKT y células T CAR.GD2 para modificar los TAM y los neuroblastos, respectivamente. Las células T CAR.GD2 ya se han evaluado clínicamente en pacientes con NB, pero la presente invención proporciona inmunoterapia combinada de células T CAR.GD2 con NKT o la IL-15 de NKT. En ciertos aspectos de la invención, las NKT están habilitadas con reactividad doble para dirigir tanto a los neuroblastos como a los TAM.

Ejemplo 12

Estudios ilustrativos

En modalidades de la invención, se presenta la localización de células NKT humanas en el sitio del tumor en el modelo hu-NSG de NB. (véase Liu y otros, *J. Clin. Invest* (2012)).

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

La IL-15 protegió a las NKT humanas activadas por antígeno de la hipoxia, y la expresión transgénica de la IL-15 en NKT transferidas adoptivamente mejoró drásticamente su actividad antimetastásica en el modelo hu-NSG de NB, Figuras 6 y 7 (Liu y otros, 2012).

En modalidades de la invención, las NKT se modifican para coexpresar CAR-GD2 funcional. Pueden incorporarse porciones coestimuladoras derivadas de CD28, 4-1BB y OX40, por ejemplo, *en cis* dentro de las moléculas CAR y proporcionar coestimulación a las células T modificadas con CAR (Pule y otros, 2008; Maher y otros, 2002; Vera y otros, 2009). Los inventores construyeron una serie de CAR que incorporan CD28, OX40 o ambos CD28/OX40 y CD28/4-1BB (Figura 11A), y descubrieron que estas moléculas pueden expresarse eficientemente en las NKT (Figura 11B). Además, la expresión de CAR permanece estable durante al menos 3 semanas de expansión de las células NKT *ex vivo* (Figura 11B). La comparación en paralelo de las células NKT CAR.GD2 y T de los mismos individuos demostró citotoxicidad *in vitro* igualmente potente contra células NB positivas a GD2 (Figura 11C). No se observó diferencia en la citotoxicidad específica de GD2 entre las NKT transducidas con ninguna de las 5 construcciones. De manera importante, las NKT CAR.GD2 conservaron su especificidad TCR nativa y mataron a los objetivos positivos a CD1d tan eficazmente como las NKT parentales (Figura 11D).

En modalidades de la invención, la activación farmacológica del gen suicida iCasp-9 elimina eficazmente los linfocitos T modificados genéticamente en pacientes con leucemia. (véase Di Stasi y otros, *N. Engl. J. Med* (2011)).

Estrategias ilustrativas

Expresar CAR.GD2 en las NKT y evaluar su citotoxicidad *in vitro* contra células NB y actividad antitumoral *in vivo* contra xenoinjertos de NB en ratones hu-NSG.

Aunque los CTL específicos de EBV modificados con CAR tienen eficacia clínica en pacientes con varios tipos de cáncer, la dependencia de la infección por EBV limita este enfoque, especialmente para pacientes jóvenes con EBV negativo. Debido a que las NKT no dependen de la infección y tienen un perfil funcional similar con las células T de memoria efectora, puede evaluarse si las NKT podrían servir como una plataforma alternativa para la inmunoterapia del cáncer redirigida por CAR. Un ensayo clínico reciente demostró que direccionar GD2 con EBV-CTL modificados con CAR puede ser eficaz en niños con NB (Pule y otros, 2008; Louis y otros, 2011); puede usarse la misma construcción CAR.GD2 para transducir las NKT. Estas NKT positivas a CAR.GD2 se expanden y su potencial antitumoral contra NB se evalúa mediante el uso de sistemas experimentales establecidos *in vitro* e *in vivo*.

(a). Expresión de CAR.GD2 en NKT. Las NKT primarias se aíslan de las PBMC de 5 individuos sanos y 5 pacientes con NB en etapa 4 en el momento del diagnóstico mediante el uso del mAAb biotina-6B11 y perlas magnéticas anti-biotina (Miltenyi) seguidas de la expansión *in vitro* con OKT3 e IL-2 como se describió previamente (Metelitsa y otros, 2004; Exley y otros, 2008). Para expresar CAR.GD2 en las NKT, las células estimuladas con OKT3 se transducen con el vector retroviral como se describe en la Figura 11B. También puede expresarse CAR.GD2 en células T del mismo PBMC como se describió previamente (de Santo y otros, 2008). La expresión de CAR.GD2 se detecta mediante análisis FACS, y las células positivas a CAR.GD2 se enriquecen mediante el uso del anticuerpo anti-idiotipo biotinilado 1A7 (Pule y otros, 2008) y perlas magnéticas anti-biotina (Miltenyi) seguidas de una expansión adicional con OKT3 e IL-2.

(b) Actividad funcional *in vitro* de las NKT CAR.GD2. Para evaluar el potencial citotóxico de las NKT CAR.GD2, pueden

cultivarse líneas celulares de NB positivas a GD2 (CHLA-255, LA-N1), células NB negativas a GD2 (LA-N-6) como control negativo y Células Jurkat J32 positivas a CD1d negativas a GD2 como control para la citotoxicidad de las células NKT restringidas a CD1d. La citotoxicidad se realiza mediante el uso de un ensayo de 4 horas de Calceína-AM con un intervalo de relaciones efector a objetivo. Las células T CAR.GD2 del mismo individuo pueden servir como control positivo. También puede medirse la respuesta de citocinas de células NKT (IFN γ e IL-4, ELISA) y la proliferación (ensayo de dilución CFSE) después de la estimulación de CAR y TCR V α 24i nativo por células NB positivas a GD2 y J32 positivas a CD1d, respectivamente. Con base en los resultados obtenidos con las NKT CAR.GD2 de 2 individuos sanos (Figura 2B-D), puede esperarse que las células NKT CAR.GD2 de donantes sanos y pacientes con NB adquieran citotoxicidad contra las células NB positivas a GD2 mientras retienen su especificidad de TCR nativa y actividad funcional.

(c) *Persistencia y referencia tumoral de las NKT CAR.GD2 in vivo.* Para examinar el efecto de la expresión de CAR.GD2 sobre la persistencia y la localización tumoral de las células NKT, pueden transducirse las NKT con eGFP-ffLuc seguido de la transducción con CAR.GD2 o control de vector. Los ratones hu-NSG se injertan con xenoinjertos de NB humanos debajo de la cápsula renal y (en 2 semanas) se inyectan i/v con NKT control o NKT CAR.GD2 10⁷. La distribución de las células NKT y la localización tumoral se monitorean a las 24, 48 y 72 horas mediante el uso de imágenes BL. Después del sacrificio de los animales, puede cuantificarse la frecuencia de las NKT humanas transferidas en la sangre, el bazo, el hígado, la médula ósea y los tejidos tumorales. Las NKT parentales y modificadas genéticamente pueden cuantificarse tanto por qPCR como por FACS, por ejemplo. La Q-PCR puede realizarse en muestras de ADN de los tejidos indicados mediante el uso de dos conjuntos de sonda/cebadores: El gen TCR α invariante V α 24-J α 18 y el transgen CAR para todas las NKT humanas y las NKT modificadas genéticamente, respectivamente. La frecuencia y el número absoluto de NKT y NKT CAR.GD2 también pueden cuantificarse por FACS mediante el uso de inmunofluorescencia de cuatro colores con anticuerpos contra CD3 humano, V β 11, V α 24-J α 18 y CAR. Las NKT y NKT CAR.GD2 también pueden compararse para la expresión de anexina-V y Ki-67 + para determinar la tasa de apoptosis y proliferación, respectivamente. Dentro de los tejidos tumorales, puede examinarse si la expresión de CAR afecta la distribución de células NKT entre las áreas normóxicas e hipóxicas, así como su colocación con células TAM y NB, mediante el uso de métodos que se conocen de microscopía confocal (Liu y otros, 2012). Los resultados de estos experimentos demuestran cómo la expresión de CAR.GD2 afecta la persistencia, localización en el sitio del tumor de la célula NKT *in vivo* y revelan el mecanismo de la función efectora de células NKT CAR.GD2 dentro de los tejidos tumorales, en ciertos aspectos de la invención.

(d) *Actividad antitumoral de NKT CAR.GD2 en el modelo ortotópico de NB en hu-NSG.* Los ratones hu-NSG se injertan debajo de la cápsula renal con células NB humanas positivas a ffLuc CHLA-255 y se dividen en tres grupos para el tratamiento con NKT, NKT CAR.GD2 10⁷ o PBS como control. La eficacia antitumoral se evalúa mediante imágenes BL semanalmente (durante 4 semanas) y tiempo de sacrificio. Las NKT CAR.GD2 logran una mayor actividad antitumoral, en modalidades específicas de la invención, mantenidas durante más tiempo en comparación con las NKT no modificadas. Aunque las células NKT CAR.GD2 y T CAR.GD2 son igualmente citotóxicas *in vitro* (Figura 11C), se espera que las primeras tengan una actividad terapéutica más fuerte en ratones debido a la muerte o polarización M1 (*por medio de* la secreción de IFN γ y GM-CSF) de los TAM. Las NKT se analizan en xenoinjertos tumorales y en tejidos normales como se describió anteriormente. También puede examinarse si la eficacia terapéutica se asocia con el reconocimiento específico directo de las células tumorales por las células NKT, la reducción de la frecuencia de TAM en los tejidos tumorales, el aumento de la polarización M1 de los TAM restantes y/o la disminución de los niveles de IL-6 humana promotora de neuroblastos (Song y otros, 2009) dentro de los tumores y sistémicamente. El examen patológico de los tejidos normales también puede evaluar la toxicidad de la inmunoterapia con células NKT. Los resultados de estos experimentos muestran el uso terapéutico de las NKT CAR.GD2 *in vivo* para aplicabilidad clínica.

(e) *Actividad antitumoral de las NKT CAR.GD2 en el modelo de NB metastásico en ratones hu-NSG.* Cuando se inyecta por vía intravenosa en ratones hu-NSG, las células CHLA-255/luc proporcionan un excelente modelo metastásico de NB que reproduce de cerca el patrón de metástasis en pacientes con NB (Figura 10B). La transferencia adoptiva de las NKT humanas solo tiene un efecto transitorio en este modelo de NB metastásico (Liu y otros, 2012). Para evaluar si la expresión de CAR.GD2 hace que las NKT sean protectoras contra las metástasis de NB, pueden inyectarse ratones con células CHLA-255/luc i.v. y dividirlos en los siguientes grupos para recibir: 1) PBS (control); 2) NKT parentales; 3) NKT CAR.GD2; 4) células T CAR.GD2. Los experimentos iniciales se llevan a cabo el día 7, que es al menos una semana antes de que las metástasis de NB sean detectables por imágenes BL. Si las NKT positivas a CAR.GD2 son eficaces en este contexto, puede repetirse el mismo tratamiento después de que las metástasis de NB sean detectables por imágenes BL. De manera postmortem, las NKT y células T se analizan en metástasis tumorales en diferentes órganos y en tejidos normales como se describió anteriormente. Puede observarse si existe acumulación de NKT CAR.GD2 en comparación con las NKT controles en la médula ósea porque es el sitio más frecuente de metástasis y recaída de NB. Los resultados de estos experimentos muestran el potencial terapéutico de NKT CAR.GD2 contra NB metastásico, en aspectos particulares de la invención.

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

La coestimulación desempeña un papel crítico en la activación, expansión y supervivencia de las NKT. En base al conocimiento actual de las principales vías coestimuladoras en las NKT, se generaron cuatro construcciones que contenían endodominios coestimuladores y sus combinaciones: CD28, 4-1BB, CD28/4-1BB y CD28/OX40, y la construcción control que carece de endodominios coestimuladores. Puede determinarse cuál de estas construcciones proporciona la coestimulación más eficaz para NKT CAR.GD2.

(a) *Actividad de NKT CAR.GD2 in vitro* con diferentes porciones coestimuladoras. Primero, puede evaluarse cómo la expresión de porciones coestimuladoras afecta *in vitro* la citotoxicidad, la producción de citocinas y la proliferación de NKT CAR-GD2 en respuesta a células NB positivas a GD2 así como a células J32 positivas a CD1d como se describe en la presente descripción. En base a la experiencia acumulada con células T (Hoyos y otros, 2010) y los datos con las NKT, puede esperarse que la actividad citotóxica de las NKT CAR.GD2 no se inflencie por porciones coestimuladoras. Por el contrario, la producción de citocinas Th1/Th2 y la proliferación probablemente estarán influenciadas por diferentes señales coestimuladoras. La detección *in vitro* puede seleccionar aquellas construcciones CAR coestimuladoras que mejoran la expansión de las células NKT y polarizan su perfil de citocinas hacia Th1.

(b) *Referencia y persistencia tumoral in vivo* de las NKT CAR.GD2 coestimuladoras. Las porciones coestimuladoras ilustrativas que se seleccionan se evalúan por su capacidad de soportar *in vivo* la persistencia y localización tumoral de las NKT modificadas con CAR.GD2. Por ejemplo, para determinar el efecto de la expresión de CD28 en CAR.GD2, pueden transducirse las NKT con eGFP-ffLuc seguido de transducción con CAR.GD2 o CAR.GD2/CD28. Los ratones hu-NSG se injertan con xenoinjertos de NB humanos y se inyectan *i/v* con NKT CAR.GD2 o CAR.GD2/CD28. La localización y persistencia del tumor de células NKT se analiza mediante el uso de imágenes BL, FACS y microscopía confocal como se describe en la presente descripción. Puede esperarse que las NKT que expresan CAR.GD2/CD28 y/u otras construcciones coestimuladoras positivas seleccionadas tengan una expansión, persistencia y acumulación en el sitio del tumor superior *in vivo*, en modalidades específicas de la invención.

(c) Actividad antitumoral de las NKT CAR.GD2 coestimuladoras en el modelo ortotópico de NB en ratones hu-NSG. Como se describe aquí, pueden usarse ratones hu-NSG con xenoinjertos NB establecidos (con células NB luminiscentes) y tratarlos con CAR.GD2, CAR.GD2/CD28 no luminiscentes y/u otras construcciones coestimuladoras. La eficacia antitumoral se evalúa mediante imágenes BL una vez por semana durante 4 semanas. Las NKT modificadas para expresar CAR.GD2 con porciones coestimuladoras tendrán una actividad antitumoral superior que aquellas con CAR.GD2 + solo, en aspectos particulares de la invención.

(d) Actividad antitumoral de las NKT CAR.GD2 coestimuladoras en el modelo de NB metastásico en ratones hu-NSG. Los mismos grupos experimentales que se describen anteriormente se evalúan en el modelo de NB metastásico como se describe anteriormente. Las NKT modificadas para expresar CAR.GD2 con porciones coestimuladoras tienen una actividad antimetastásica superior que aquellas con CAR.GD2 solo, en modalidades específicas de la invención.

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

Para maximizar el potencial terapéutico de las NKT contra NB, puede combinarse la expresión de la IL-15 y CAR.GD2 que permitirá la persistencia a largo plazo de las células transferidas adoptivamente y proporcionará la capacidad de matar tanto a los TAM que soportan el tumor como a los propios neuroblastos. La seguridad adicional de las células transducidas se proporciona mediante el desarrollo de un vector, en el que el gen suicida iCasp-9 se clona junto con los genes CAR e IL-15. Para lograr la expresión eficaz de los tres genes (IL-15, iCasp-9 y CAR.GD2) en las NKT, puede generarse una sola construcción retroviral tricistronica (Figura 13), análoga a una que se ha demostrado que expresa con éxito iCasp9, CAR.CD19-CD28 e IL-15 en células T que permitieron la expresión eficaz y funcional de los tres genes (Hoyos y otros, 2010).

(a) Expresión y actividad funcional *in vitro* de IL-15 y CAR.GD2 en las NKT. Mediante el uso del mismo procedimiento descrito anteriormente, pueden transducirse las NKT con una construcción retroviral tricistronica, que contiene secuencias de ADNc para IL-15, CAR-GD2/CD28 e iCasp-9 (Figura 13). Para controlar el efecto de la IL-15 o CAR.GD2 solos, pueden compararse las NKT transducidas con IL-15/CAR.GD2 con aquellas transducidas con IL-15 o CAR.GD2 solas. También puede evaluarse la funcionalidad del gen suicida iCasp-9 mediante el uso del tratamiento *in vitro* de las células transducidas con CID AP1903 como se describió previamente (Quintarelli y otros, 2007; Tey y otros, 2007).

(b) Referencia y persistencia de NKT CAR.GD2/IL-15 *in vivo*. Para examinar si la coexpresión de la IL-15 y CAR.GD2 mejora la referencia y persistencia del tumor de células NKT, pueden transducirse las NKT con eGFP-ffLuc seguido de la transducción con CAR.GD2/IL-15. Los ratones hu-NSG se injertan con xenoinjertos NB humanos y se inyectan *i/v* con NKT CAR.GD2, positivas a IL-15, positivas a CAR.GD2/IL-15, o controles (10^7 células/ratón). La localización del tumor de células NKT se monitorea a 1, 2, 3, 5 y 7 días mediante el uso de imágenes BL seguido de sacrificio y análisis por FACS en la sangre, el bazo, el hígado, la médula ósea y los tejidos tumorales. La distribución de las NKT infiltrantes dentro de los tejidos tumorales se analiza mediante microscopía confocal, que incluye el análisis cuantitativo de su frecuencia en áreas hipóxicas mediante el uso de la tinción EF5 (Liu y otros, 2012). Las NKT que expresan la IL-15 y CAR.GD2 tendrán *in vivo* una expansión y persistencia superiores, así como una acumulación y supervivencia mejoradas en el sitio del tumor que incluye áreas hipóxicas, en modalidades específicas de la invención.

(c) Control de NKT transducidas con CAR.GD2/IL-15 *por medio* de la activación farmacológica de la caspasa-9. Dado que la construcción retroviral incorpora el iCasp-9 (Figura 12), puede evaluarse si las NKT modificadas genéticamente pueden eliminarse de manera eficaz mediante la activación farmacológica del gen suicida tras la administración de la molécula pequeña CID AP1903 (Quintarelli y otros, 2007; Tey y otros, 2007). Después de lograr la expansión/persistencia sostenida *in vivo* de las NKT CAR.GD2/IL-15 en ratones hu-NSG, a los ratones se les inyecta *i/p* con CID AP1903. Los ratones son

fotografiados antes y 24 horas después de la inyección del fármaco. Si la señal BL desaparece, pueden sacrificarse los ratones y realizar qPCR para el transgén CAR mediante el uso del ADN de tejidos múltiples para confirmar la eliminación de las NKT transgénicas. Si la eliminación no es completa, puede valorarse la dosis de CID AP1903 para lograr el efecto completo como se describe para las células T.

(d) Actividad antitumoral de las NKT CAR.GD2/IL-15 en modelos hu-NSG de NB. Como se describió anteriormente, pueden usarse ratones hu-NSG con xenoinjertos NB ortotópicos o metastásicos establecidos y tratarlos con NKT CAR.GD2, IL-15 □ CAR.GD2/IL-15 □ o control. La eficacia antitumoral se evalúa mediante imágenes BL una vez por semana durante 4 semanas. Las NKT CAR.GD2/IL-15 son más eficaces que las NKT CAR.GD2 o IL-15, en ciertas modalidades.

Producir un vector retroviral de grado GMP y validar su actividad mediante el uso de NKT de pacientes con NB.

Los resultados de las evaluaciones preclínicas de NKT transducidas con varias construcciones CAR.GD2 o CAR.GD2/IL-15 anteriores informan las construcciones que generan NKT terapéuticas que son seguras y tienen un alto potencial antitumoral para pacientes con NB. En modalidades específicas, CAR.GD2/IL-15 tiene el potencial terapéutico más alto de las construcciones evaluadas. Pueden utilizarse construcciones alternativas (por ejemplo, CAR.GD2/CD28, CAR.GD2/4-1.BB, o la 1^{ra} generación CAR.GD2). Se genera una línea celular productora retroviral estable y se produce un stock del vector de grado clínico que se usará para transducir las NKT derivadas del paciente.

(a) Generar una línea celular productora de retrovirales de grado clínico y sobrenadante retroviral. Puede generarse la línea celular productora retroviral estable, que produce partículas virales que codifican CAR.GD2/IL-15 o una de las construcciones alternativas. La línea celular de empaquetado PG13 que produce partículas retrovirales del pseudotipo GaLv se generará como se describió previamente (Pule y otros, 2008; Savoldo y otros, 2011). Puede producirse una línea de productor estable con un título viral > 10⁶ v.p. por ml (se basa en la infectividad de las células HeLa). Aunque el título puede disminuir cuando se fabrica el producto a granel, aún debe superar los 5 x 10⁵ v.p. por ml, que proporcionará una amplia cantidad de virus con actividad adecuada para transducir las células NKT, en ciertas modalidades.

(b) Preparar NKT modificadas genéticamente de pacientes con NB. Las NKT pueden aislarse de PBMC de pacientes con NB fallecidos mediante el uso de mAb biotina-6B11 y perlas magnéticas anti-biotina (Miltenyi) seguidas de la expansión *in vitro* en placas recubiertas con OKT3. Para validar la actividad de un vector de grado clínico, las NKT activadas con OKT3 se transducen con el sobrenadante retroviral mediante el uso de placas de 24 pocillos recubiertas con fragmentos de retronectina recombinante como se describió previamente (Pule y otros, 2008). Después de la transducción, las NKT se expanden con la IL-2 para alcanzar el número de células requerido para el protocolo clínico. La eficacia de la transducción se mide mediante la cuantificación de la expresión del epítipo idiotipo CAR.

(c) Actividad funcional *in vitro*. Las NKT modificadas con el vector de grado clínico se evalúan mediante el uso de experimentos funcionales *in vitro* que son apropiados para la construcción seleccionada y se describen en otra parte de la presente descripción.

(d) La referencia y la persistencia *in vivo* se examinan como se describe en otra parte de la presente descripción.

(e) El control de NKT modificadas genéticamente *por medio de* la activación farmacológica de la caspasa-9 se examina como se describe en otra parte de la presente descripción.

(f) La actividad antitumoral en los modelos NB se examina como se describe en otra parte de la presente descripción.

Puede demostrarse que las NKT modificadas genéticamente de grado GMP pueden producirse a partir de PBMC específicas del paciente en cantidades clínicamente suficientes y tienen actividad antitumoral mientras que conservan sus funciones fisiológicas.

Ejemplo 13

Modalidades particulares de las nkt con receptores de antígenos quiméricos

En las modalidades de la invención, está presente una célula NKT con uno o más CAR, y la célula NKT también puede expresar la IL-15, la IL-2, la IL-4 y/o la IL-7. Véase la Figura 11A para construcciones de CAR ilustrativas.

La figura 14 muestra la generación y expansión eficaz de NKT CAR.GD2. La figura 15 muestra que las NKT CAR.GD2 están dotadas de doble especificidad contra los objetivos positivos a GD2 y positivos a CD1d. La figura 16 demuestra endodominios coestimuladores en construcciones CAR.GD2 que afectan el perfil de citocinas de células NKT. La figura 17 muestra endodominios coestimuladores en construcciones CAR.GD2 que afectan las vías de señalización Th1 y Th2 en las NKT. La figura 18 muestra la eficacia terapéutica de NKT CAR.GD2 contra metástasis de NB en ratones hu-NSG.

Por lo tanto, las Figuras 14-18 demuestran lo siguiente: 1) Las GD2.CAR pueden expresarse de manera estable en NKT humanas y se mantiene una expresión transgénica de alto nivel durante el período suficiente para una expansión a escala

clínica *ex vivo*; 2) las NKT GD2-CAR exhiben doble especificidad con alto potencial citotóxico contra las células NB positivas a GD2 y los macrófagos positivos a CD1d (M2), pero no matan las células negativas a GD2 y CD1d; 3) los endodominios CD28 y 4-1BB sesgan la respuesta de las citocinas de las NKT CAR.GD2 al patrón Th2 y Th1, respectivamente; 4) La polarización Th2 inducida por CD28 se asocia con la activación de AKT y STAT6. La polarización Th1 inducida por 4-1BB se asocia con la activación de las vías MAPK p65 NFκBκ y p38; y 5) las NKT que expresan GD2.CAR tienen una actividad terapéutica potente en un modelo metastásico de neuroblastoma en ratones hu-NSG, que proporciona una racionalidad para el ensayo clínico de NKT doble específicas en niños con neuroblastoma. En modalidades de la invención, una construcción de expresión en la NKT comprende 4-1BB o una combinación de 4-1BB y CD28 de modo que se induce la polarización Th1, de esa manera conduce a vías relevantes para el cáncer; en modalidades específicas, el CD28 permite una proliferación mejorada de las células NKT.

Referencias

Publicaciones

Affara, N.I., y Coussens, L.M. 2007. IKKalpha at the crossroads of inflammation and metastasis. *Cell* 129: 25-26.

Aliavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C. y Mantovani, A. 2008. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Grit Rev. Oncol. Hematol.* 66:1-9.

Baev,D.V., Peng,X.H., Song,L., Barnhart,J.R., Crooks,G.M., Weinberg,K.I., y Metelitsa,L.S. 2004. Distinct homeostatic requirements of CD4+ and CD4-subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood* 104:4150-4156 (2004).

Battaglia,F., Delfino,S., Merello,E., Puppo,M., Piva,R., Varesio,L., y Bosco,M.C. 2008. Hypoxia transcriptionally induces macrophage-inflammatory protein-3alpha/CCL-20 in primary human mononuclear phagocytes through nuclear factor (NF)-kappaB. *J. Leukoc. Biol.* 83:648-662.

Bendelac,A. y otros CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268, 863-865 (1995).

Bendelac,A., Savage,P.B., y Teyton,L. The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 297-336 (2007).

Berzofsky,J.A., y Terabe, M. 2009 The contrasting roles of NKT cells in tumor immunity. *Curro Mol. Med.* 9:667-672.

Brown,E.R., Charles,K.A., Hoare,S.A., Rye,R.L., Jodrell,D.I., Aird,R.E., Vora,R., Prabhakar,U., Nakada,M., Corringham,R.E. y otros 2008. A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF-alpha inhibitor, in patients with advanced cancer. *Ann. Oncol.* 19:1340-1346.

Chang,D.H. y otros Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J. Exp. Med.* 201, 1503-1517 (2005).

Crowe,N.Y., Coquet,J.M., Berzins,S.P., Kyparissoudis,K., Keating,R., Pellicci,D.G., Hayakawa,Y., Godfrey,D.I., y Smyth,M.J. 2005. Differential anti-tumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* 202:1279-1288 (2005).

De Santo, C. y otros Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. *J. Clin. Invest* 118, 4036-4048 (2008).

De,S.C., Arscott,R., Booth,S., Karydis,I., Jones,M., Asher,R., Salio,M., Middleton,M., y Cerundolo,V. 2010. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-1 O-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A *Nat. Immunol.* 11:1039-1046.

Dhodapkar,M.V. Harnessing human CD1d restricted T cells for tumor immunity: progress and challenges. *Front Biosci.* 14, 796-807 (2009).

Dhodapkar,M.V., Geller,M.D., Chang,D.H., Shimizu,K., Fujii,S.I., Dhodapkar,K.M., y Krasovsky, J. 2003. A Reversible Defect in Natural Killer T Cell Function Characterizes the Progression of Premalignant to Malignant Multiple Myeloma. *J. Exp. Med.*

Di,S.A. y otros Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 1673-1683 (2011).

Dotti,G., Savoldo,B., y Brenner,M. Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors: "are we nearly there yet?". *Hum. Gene Ther.* 20, 1229-1239 (2009).

- Exley, M.A. y otros Selective activation, expansion, and monitoring of human iNKT cells with a monoclonal antibody specific for the TCR alpha-chain CDR3 loop. *Eur. J. Immunol.* 38, 1756-1766 (2008).
- 5 Fehniger, T.A. y otros Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 193, 219-231 (2001).
- Friedberg, J., Jacobsen, E., Neubergh, D., Kutok, J., Munoz, O., Boussiotis, V., Reynolds, H., Fisher, D., Szot, A., Van Den, A.A. y otros 2008. Targeting the follicular lymphoma microenvironment through blockade of TNFalpha with etanercept. *Leuk. Lymphoma* 49:902-909.
- 10 Giassi, L.J., Pearson, T., Shultz, L.D., Laning, J., Biber, K., Kraus, M., Woda, B.A., Schmidt, M.R., Woodland, R.T., Rossini, A.A. y otros 2008. Expanded CD34+ human umbilical cord blood cells generate multiple lymphohematopoietic lineages in NOD-scid IL2rgamma(null) mice. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 233:997-1012.
- 15 Godfrey, D.I., Stankovic, S., y Baxter, A.G. Raising the NKT cell family. *Nat. Immunol.* 11, 197-206 (2010).
- Goillot, E., Combaret, V., Ladenstein, R., Baubet, D., Blay, J.Y., Philip, T., y Favrot, M.C. 1992. Tumor necrosis factor as an autocrine growth factor for neuroblastoma. *Cancer Res.*, 52:3194-3200.
- 20 Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F., y Karin, M. 2004. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118:285296.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., y Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Gel/140*: 883-899.
- 25 Hoyos, V. y otros Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia* 24, 1160-1170 (2010).
- Hsu, C. y otros Cytokine-independent growth and clonal expansion of a primary human CD8+ T-cell clone following retroviral transduction with the IL-15 gene. *Blood* 109, 5168-5177 (2007).
- 30 Ishikawa, A. y otros A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 1910-1917 (2005).
- 35 Kershaw, M.H. y otros A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 6106-6115 (2006).
- Kim, C.H., Butcher, E.C., y Johnston, B. 2002. Distinct subsets of human Valpha24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends Immunol.* 23:516-519.
- 40 Kim, C.H., Johnston, B., and Butcher, E.C. 2002. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among Valpha24(+)Vbeta11 (+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100: 11-16.
- 45 Kim, D.H. y otros 4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* 180, 2062-2068 (2008).
- 50 Kim, E.S., Serur, A., Huang, J., Manley, C.A., McCrudden, K.W., Frischer, J.S., Soffer, S.Z., Ring, L., New, T., Zabski, S. y otros 2002. Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:11399-11404.
- Kronenberg, M. y Gapin, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 557-568 (2002).
- 55 Kunii, N. y otros Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci.* (2009).
- Lantz, O. y Bendelac, A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8-T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* 180, 1097-1106 (1994).
- 60 Liu, D. y otros IL-15 protects NKT cells from inhibition by tumor-associated macrophages and enhances antimetastatic activity. *J. Clin. Invest* (2012).
- Louis, C.U. y otros Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 118, 6050-6056 (2011).
- 65 Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Riviere, I., y Sadelain, M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed

- by a single chimeric TCRzeta/CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.* 20, 70-75 (2002).
- Mantovani,A, Aliavena,P., Sica,A, y Balkwill,F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444.
- 5 Mantovani,A, Schioppa,T., Porta,C., Aliavena,P., y Sica,A 2006. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 25:315-322.
- Maris,J.M., Hogarty,M.D., Bagatell,R., y Cohn,S.L. 2007. Neuroblastoma. *Lancet* 369:21 06-2120.
- 10 Matsuda,J.L., Gapin,L., Sidobre,S., Kieper,W.C., Tan,J.T., Ceredig,R., Surh,C.D., and Kronenberg,M. 2002. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat. Immunol.* 3:966-974.
- Metelitsa,L.S. y otros Natural killer T cells infiltrate neuroblastomas expressing the chemokine CCL2. *J. Exp. Med.* 199, 1213-1221 (2004).
- 15 Metelitsa,L.S., Naidenko,O.V., Kant,A, Wu,H.W., Loza,M.J., Perussia,B., Kronenberg,M., y Seeger,R.C. 2001. Human NKT cells mediate anti-tumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1 d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J. Immunol.* 167:3114-3122.
- 20 Molling, J.W. y otros Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 25, 862-868 (2007).
- Motohashi,S. y otros A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J. Immunol.* 182, 2492-2501 (2009).
- 25 Nieda,M. y otros Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* 103, 383-389 (2004).
- O'Konek,J.J., Iliarionov,P., Khursigara,D.S., Ambrosino,E., Izhak,L., Castillo,B.F., Raju,R., Khalili,M., Kim,H.Y., Howell,AR. y otros 2011. Mouse and human iNKT cell agonist beta-mannosylceramide reveals a distinct mechanism of tumor immunity. *J. Clin. Invest* 121 :683-694.
- 30 Pietras,A., Hansford,L.M., Johnsson,A.S., Bridges,E., Sjolund,J., Gisselsson,D., Rehn,M., Beckman,S., Noguera,R., Navarro,S. y otros 2009. HIF-2alpha maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106:16805-16810.
- 35 Pikarsky,E., Porat,R.M., Stein,I., Abramovitch,R., Amit,S., Kasem,S., Gutkovich-Pyest,E., Urieli-Shoval,S., Galun,E., y Ben-Neriah,Y. 2004. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431 :461-466.
- 40 Porcelli,S., Yockey,C.E., Brenner,M.B., y Balk,S.P. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8-alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J. Exp. Med.* 178, 1-16 (1993).
- 45 Porter,D.L., Levine,B.L., Kalos,M., Bagg,A., y June,C.H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 365, 725-733 (2011).
- Pule,M.A. y otros Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat. Med.* 14, 1264-1270 (2008).
- 50 Quintarelli,C. y otros Co-expression of cytokine and suicide genes to enhance the activity and safety of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 110, 2793-2802 (2007).
- Reynolds,C.P., Tomayko,M.M., Donner,L., Helson,L., Seeger,R.C., Triche,T.J., y Brodeur,G.M. 1988. Biological classification of cell lines derived from human extra-cranial neural tumors. *Prog. Clin. Biol. Res.* 271 :291-306.
- 55 Riedl,S.J. y Salvesen,G.S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 405-413 (2007).
- Sato,N. y otros Development of an IL-15-autocrine CD8 T-cell leukemia in IL-15-transgenic mice requires the cis expression of IL-15Ralpha. *Blood* 117, 4032-4040 (2011).
- 60 Savoldo,B. y otros CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J. Clin. Invest* 121, 1822-1826 (2011).
- Sica,A y Bronte,V. 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J. Clin. Invest* 117:1155-1166.
- 65

- Sica,A, Larghi,P., Mancino,A, Rubino,L., Porta,C., Totaro,M.G., Rimoldi,M., Biswas,S.K., Aliavena,P., y Mantovani,A 2008. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin. Cancer Biol.* 18:349-355.
- 5 Song,L. y otros Oncogene MYCN regulates localization of NKT cells to the site of disease in neuroblastoma. *J. Clin. Invest* 117, 2702-2712 (2007).
- Song,L. y otros Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J. Clin. Invest* 119, 1524-1536 (2009).
- 10 Straathof,K.C. y otros An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 105, 4247-4254 (2005).
- Swann,J., Crowe,N.Y., Hayakawa,Y., Godfrey,D.I., y Smyth,M.J. 2004. Regulation of antitumor immunity by CD1 d-restricted NKT cells. *Immunol. Cell Biol.* 82:323-331.
- 15 Swann, J.B., Coquet,J.M., Smyth,M.J., y Godfrey,D.I. CD1-restricted T cells and tumor immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 314, 293-323 (2007).
- Szlosarek,P., Charles,K.A., y Balkwill,F.R. 2006. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur. J. Cancer* 42:745-750.
- 20 Szlosarek,P.W., y Balkwill,F.R. 2003. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol.* 4:565-573.
- Tachibana,T. y otros Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 11, 7322-7327 (2005).
- 25 Tahir,S.M. y otros Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J. Immunol.* 167, 4046-4050 (2001).
- 30 Tey,S.K., Dotti,G., Rooney,C.M., Heslop,H.E., y Brenner,M.K. Inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of allodepleted T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 913-924 (2007).
- Thomas,S.Y., Hou,R., Boyson,J.E., Means,T.K., Hess,C., Olson,D.P., Strominger,J.L., Brenner,M.B., Gumperz,J.E., Wilson,S.B. y otros 2003. CD1 d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th 1-type inflammatory homing cells. *J. Immunol.* 171 :2571-2580.
- 35 Till,B.G. y otros Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 112, 2261-2271 (2008).
- 40 Uldrich,A.P. y otros NKT cell stimulation with glycolipid antigen in vivo: costimulation-dependent expansion, Bim-dependent contraction, and hyporesponsiveness to further antigenic challenge. *J. Immunol.* 175, 3092-3101 (2005). van der Vliet,H.J. y otros Circulating myeloid dendritic cells of advanced cancer patients result in reduced activation and a biased cytokine profile in invariant NKT cells. *J. Immunol.* 180, 7287-7293 (2008).
- 45 Vera,J.F. y otros Accelerated production of antigen-specific T cells for preclinical and clinical applications using gaspermeable rapid expansion cultureware (G-Rex). *J. Immunother.* 33, 305-315 (2010)
- Vera,J.F., Brenner,M.K., & Dotti,G. Immunotherapy of human cancers using gene modified T lymphocytes. *Curr. Gene Ther.* 9, 396-408 (2009).
- 50 Vinay,D.S. y otros CD137-deficient mice have reduced NK/NKT cell numbers and function, are resistant to lipopolysaccharide-induced shock syndromes, and have lower IL-4 responses. *J. Immunol.* 173, 4218-4229 (2004).
- Waldmann,T.A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 6:595-601.
- 55 Yahata,T., Ando,K., Nakamura,Y., Ueyama,Y., Shimamura,K., Tamaoki,N., Kato,S., y Hotta,T. 2002. Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. *J. Immunol.* 169:204-209.
- 60 Yanagisawa, K. y otros Hyporesponsiveness to natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide in cancer-bearing state mediated by CD11b+ Gr-1+ cells producing nitric oxide. *Cancer Res.* 66, 11441-11446 (2006).
- 65 Yanagisawa,K., Seino,K., Ishikawa,Y., Nozue,M., Todoroki,T., y Fukao,K. 2002. Impaired proliferative response of V alpha 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide. *J. Immunol.* 168:6494-6499.

Zaini,J. y otros OX40 ligand expressed by DCs costimulates NKT and CD4+ Th cell antitumor immunity in mice. J. Clin. Invest 117, 3330-3338 (2007).

5 Zou,W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. Nat. Rev. Cancer 5, 263-274 (2005).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula T asesina natural modificada genéticamente que comprende una construcción de expresión que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) con un dominio de señalización intracelular adecuado.
2. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el CAR es una fusión de un scFv fusionado con un dominio transmembrana CD3-zeta y un endodominio o endodominios intracelulares.
- 10 3. La célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde los dominios de señalización intracelular se seleccionan de:
el dominio de señalización intracelular de un complejo de receptor y antígeno de células T, tal como la cadena zeta de CD3, los dominios de señalización coestimuladora Fcγ RIII, CD28, DAP10 y CD2, solos o en serie con CD3 zeta.
- 15 4. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, donde el dominio intracelular se selecciona de parte o la totalidad de uno o más de los siguientes:
cadena TCR zeta, CD28, OX40/CD134, 1BB/CD137, FcεR1γ, ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132 y CD40.
- 20 5. La célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde CAR comprende endodominios coestimuladores derivados de CD28, OX40 y/o CD137.
6. La célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se emplean uno o múltiples dominios citoplasmáticos.
- 25 7. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la célula NKT comprende además una construcción que codifica IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 o una combinación de estas.
- 30 8. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la célula codifica IL-2.
9. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde la célula codifica IL-15.
- 35 10. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la construcción de expresión comprende un gen suicida inducible.
- 40 11. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el gen suicida se selecciona del gen suicida de la capase-9 y la timidina quinasa.
12. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además una etiqueta CD34.
- 45 13. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la célula NKT tiene las propiedades de las células NKT reactivas a CD1d invariantes de Vα24.
14. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde las células NKT modificadas genéticamente son adecuadas con el fin de mejorar su crecimiento en condiciones hipóxicas y/o facilitar su actividad antitumoral.
- 50 15. Una célula T asesina natural modificada genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la célula NKT es adecuada para atacar células tumorales y también el tejido que soporta el crecimiento de células tumorales.
- 55 16. Una célula T asesina natural modificada genéticamente que comprende una construcción que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 60 17. Una célula T asesina natural modificada genéticamente como se define en la reivindicación 16, en donde el cáncer se selecciona de neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de próstata, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia mieloide, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica, cáncer de tiroides, cáncer folicular de tiroides, síndrome de mielodisplasia (MDS), tumores de origen mesenquimatoso, fibrosarcoma,
- 65

5 rabdomiosarcomas, melanoma, melanoma uveal, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, glioblastoma, tumor
benigno de la piel, cáncer renal, linfoma anaplásico de células grandes, carcinoma esofágico de células
escamosas, carcinoma hepatocelular, carcinoma folicular de células dendríticas, cáncer intestinal, cáncer muscular
invasivo, tumor de la vesícula seminal, carcinoma epidérmico, cáncer de bazo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza
y cuello, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de la retina, cáncer
10 biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de útero, cáncer de testículos, cáncer
de tejido conectivo, hipertrofia prostática, mielodisplasia, macroglobinemia de Waldenstrom, síndrome
mielodisplásico del cáncer nasofaríngeo, neuroendocrino, mesotelioma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi,
carcinoide, esofagogástrico, cáncer de trompa de Falopio, cáncer peritoneal, tumor seroso papilar tipo mulleriano,
ascitis maligna, tumor estromal gastrointestinal (GIST) y un síndrome de cáncer hereditario seleccionado del
síndrome de Li-Fraumeni y el síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL).

- 15 18. Una célula T asesina natural modificada genéticamente para su uso de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 16 a 17, en donde las células NKT son para administración sistémica.
- 20 19. Una célula T asesina natural modificada genéticamente para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde
las células NKT son para administración parenteral.
- 25 20. Una célula T asesina natural modificada genéticamente para su uso de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 16 a 19, en donde las células NKT son autólogas.
- 30 21. Una célula T asesina natural modificada genéticamente para su uso de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 16 a 19, en donde las células NKT son alogénicas.
- 35 22. Una célula T asesina natural modificada genéticamente para su uso de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 16 a 21, en donde la dosis terapéutica está en el intervalo de 10^6 a 10^9 células.
23. Una célula T asesina natural modificada genéticamente para su uso de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 16 a 22, en donde AP20187, AP1903 o una mezcla de estos se administra para activar un gen
suicida de caspasa-9 inducible en la célula.
24. Una célula T asesina natural modificada genéticamente para su uso de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones 16 a 22, en donde las células NKT comprenden un gen suicida inducible que es timidina quinasa,
y en donde se administra ganciclovir para activar la timidina quinasa en la célula.

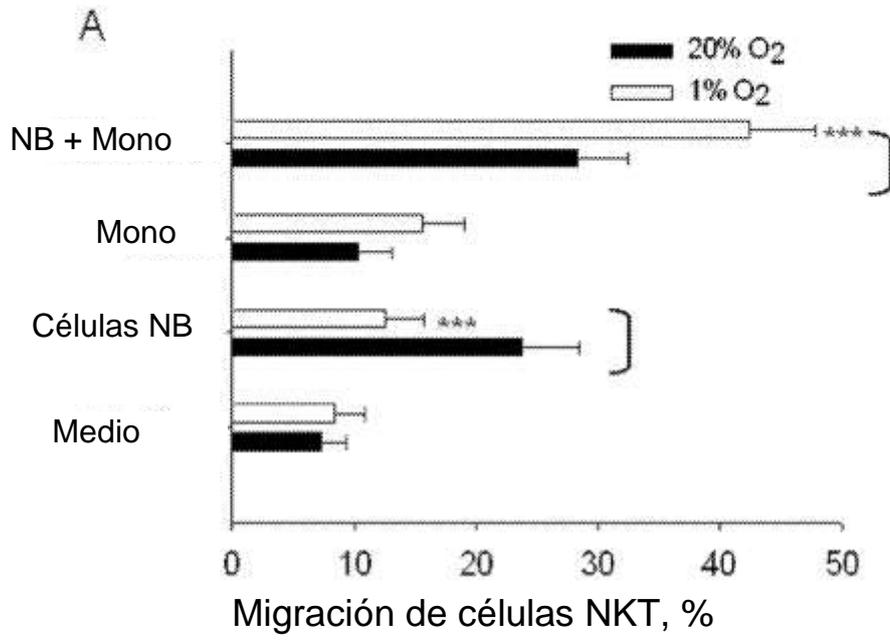
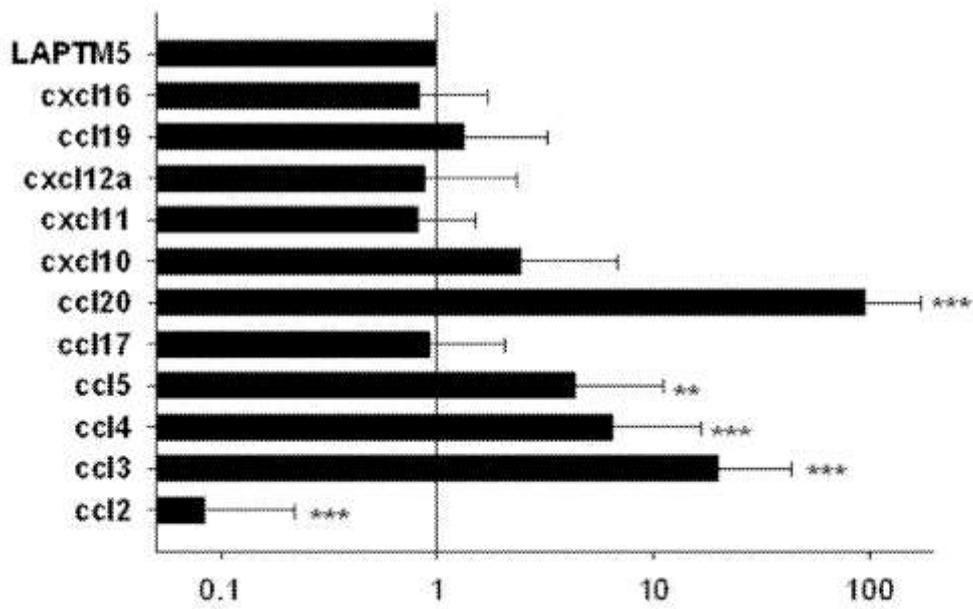


Figura 1

B



Cambio de plegamiento de expresión de ARN

Figura 1

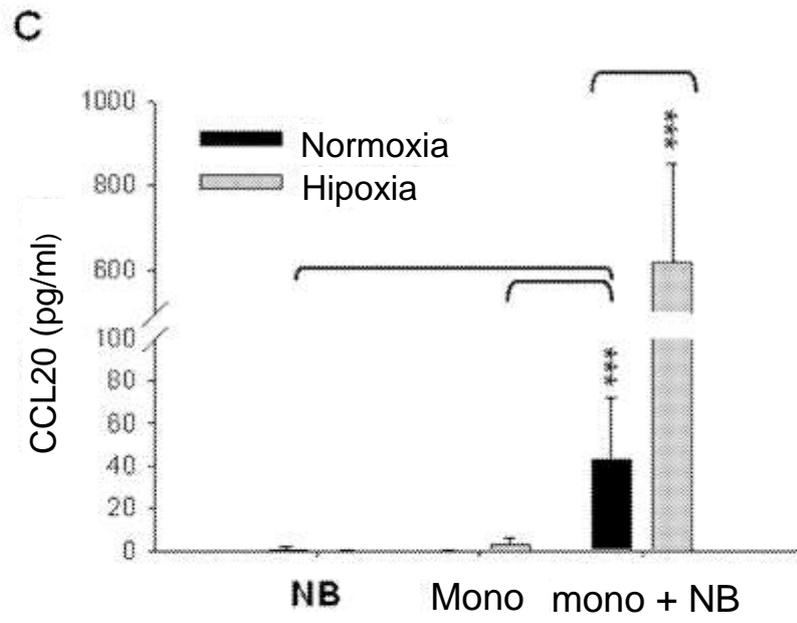


Figura 1

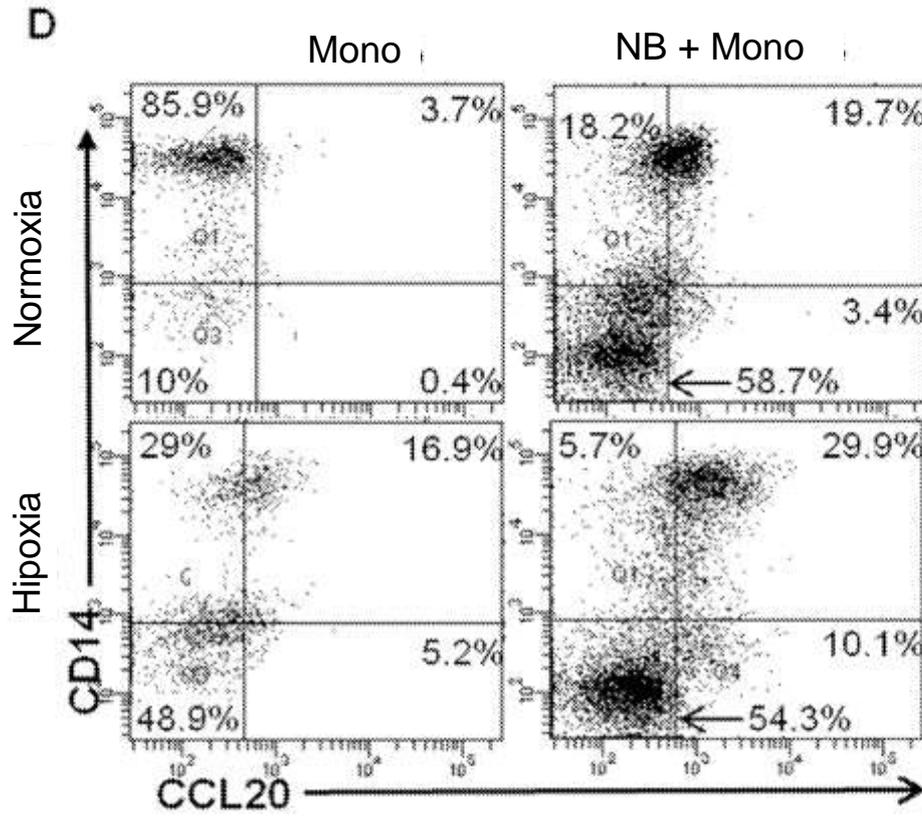


Figura 1

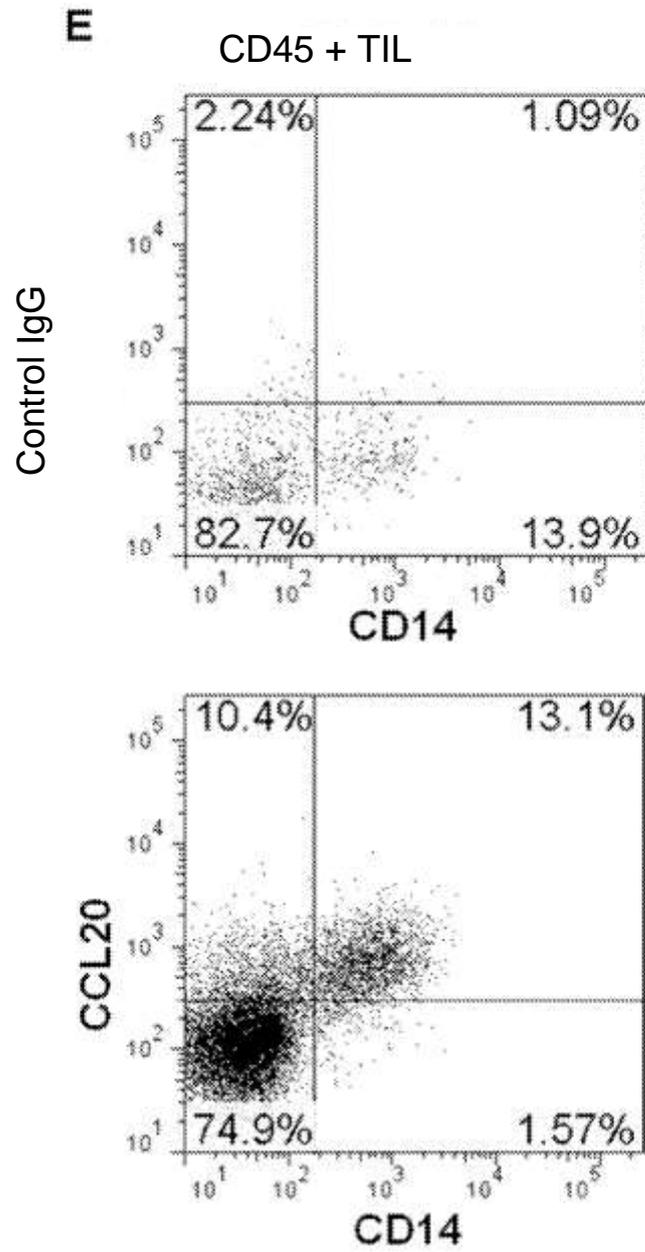


Figura 1

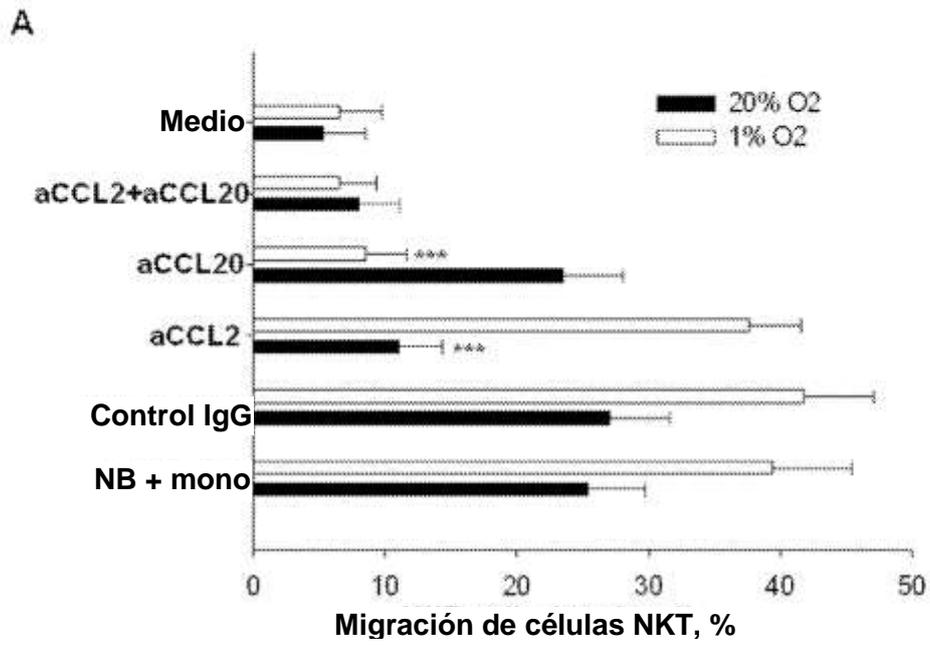


Figura 2

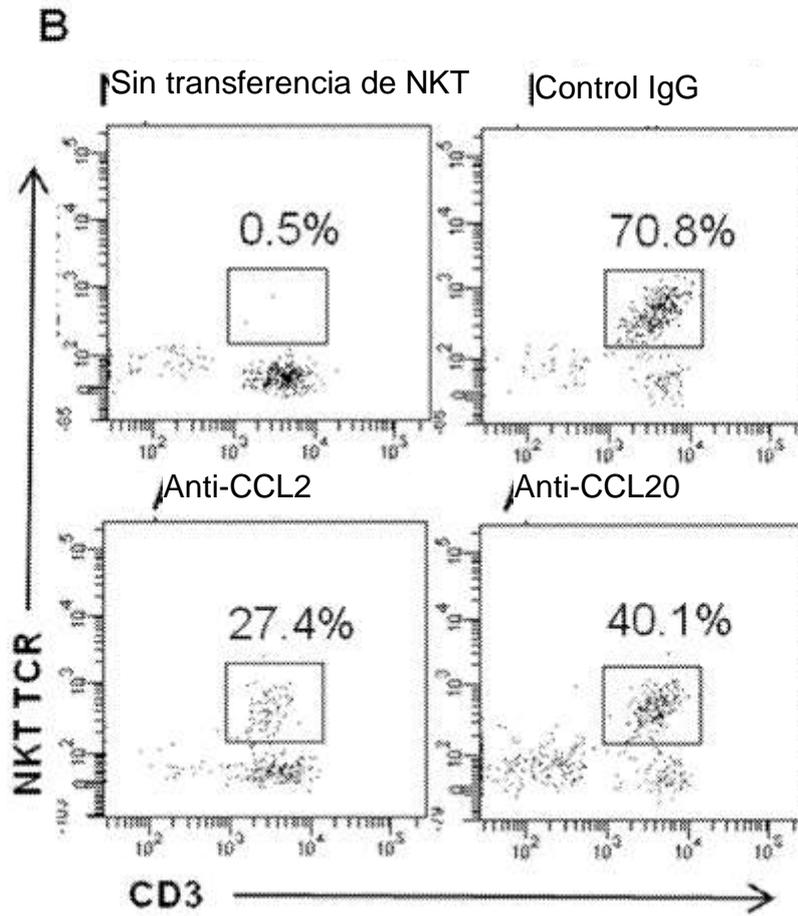


Figura 2

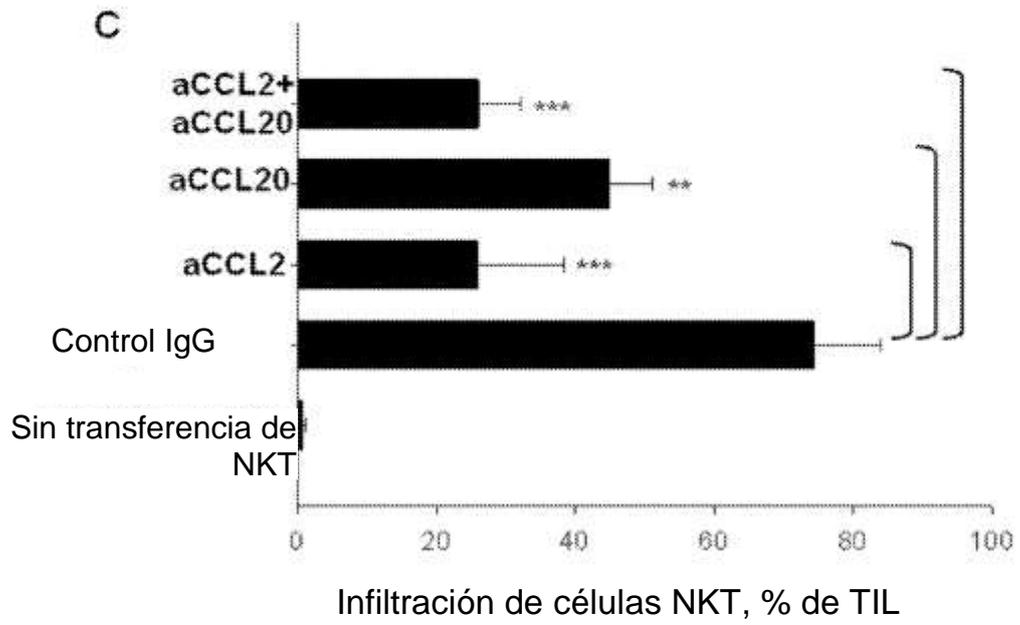


Figura 2

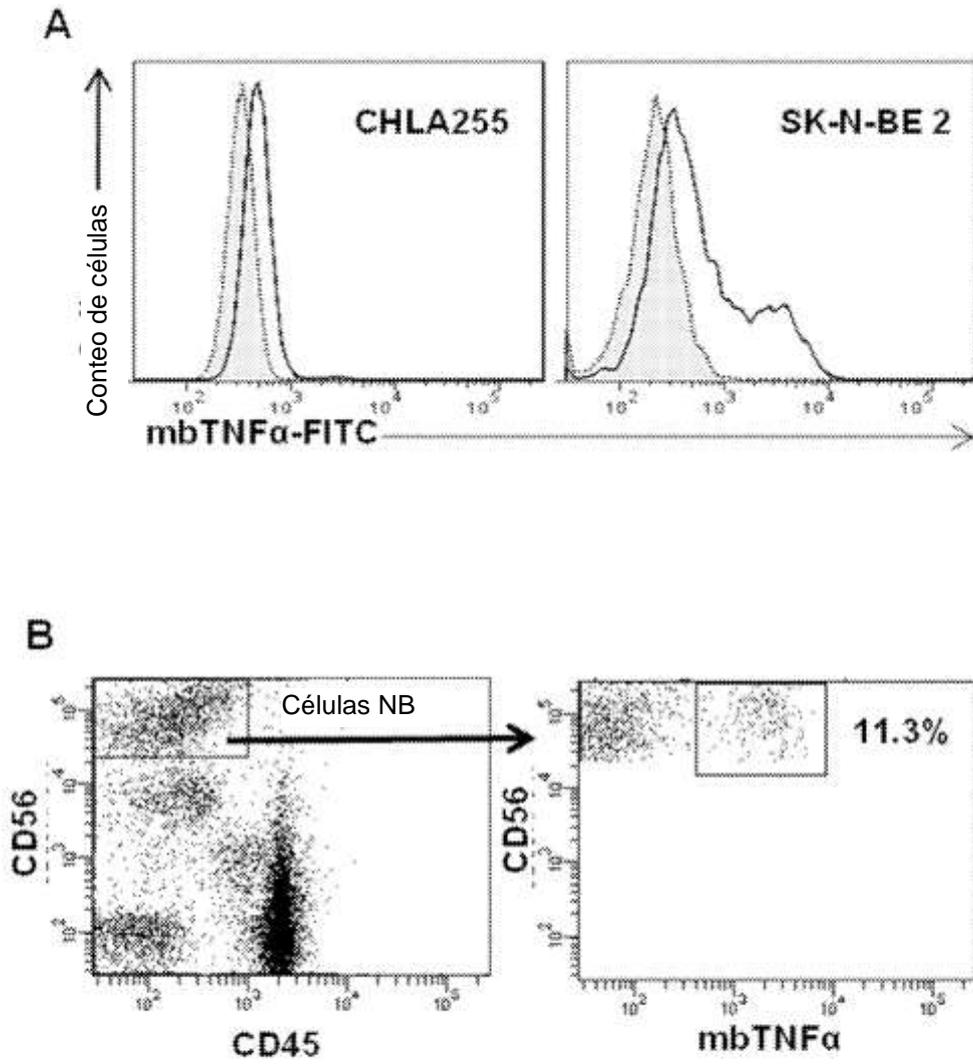


Figura 3

C

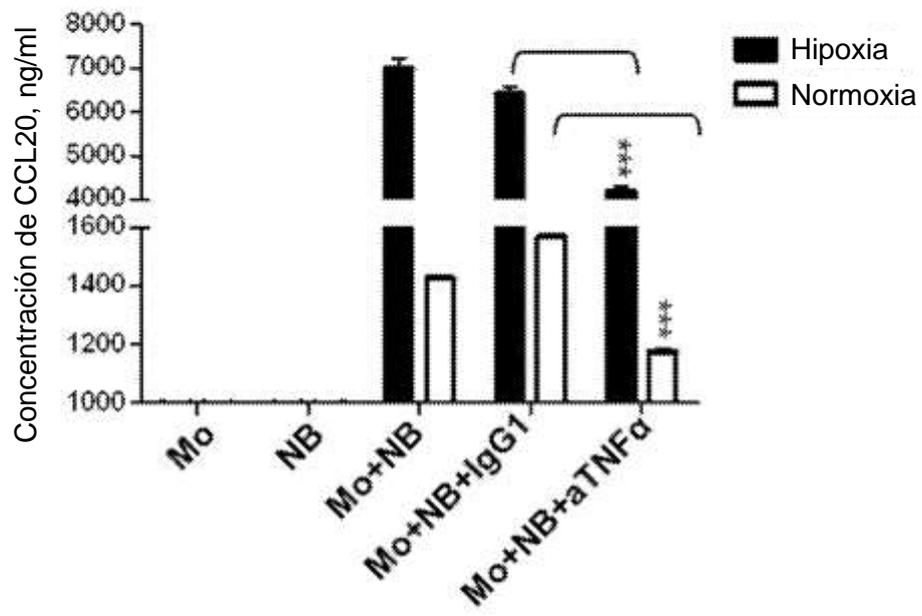


Figura 3

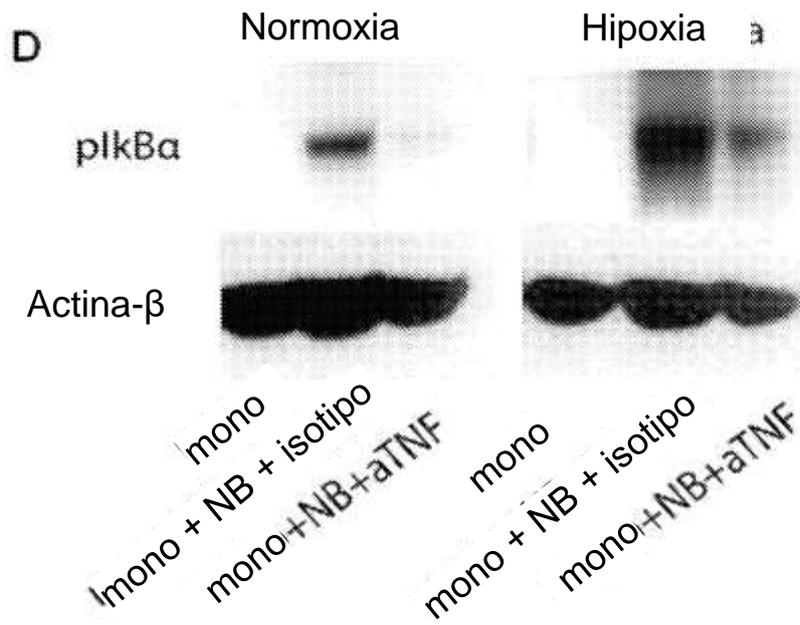


Figura 3

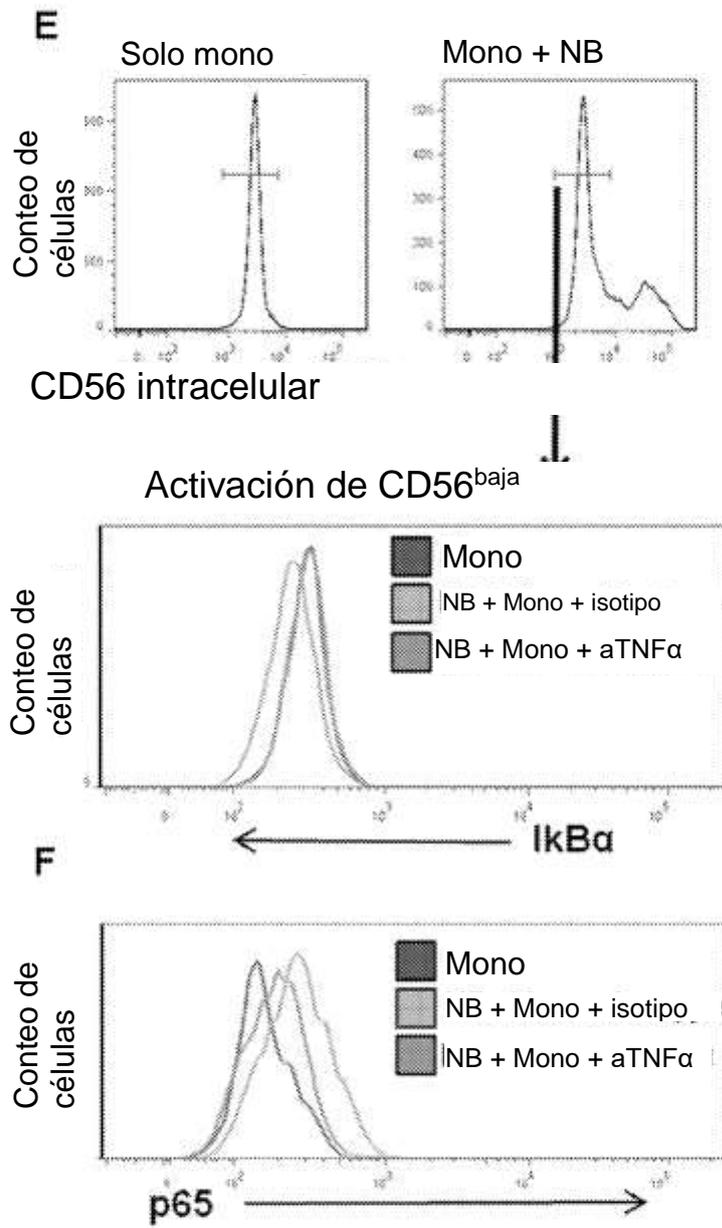


Figura 3

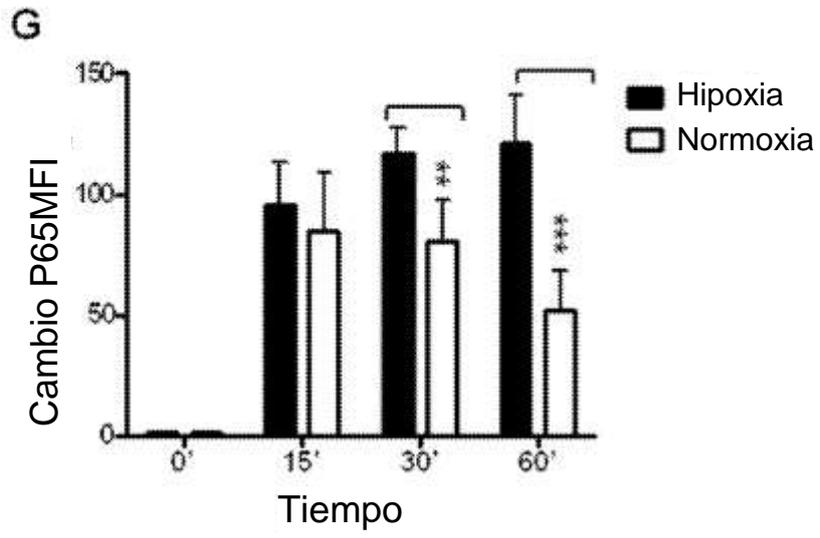


Figura 3

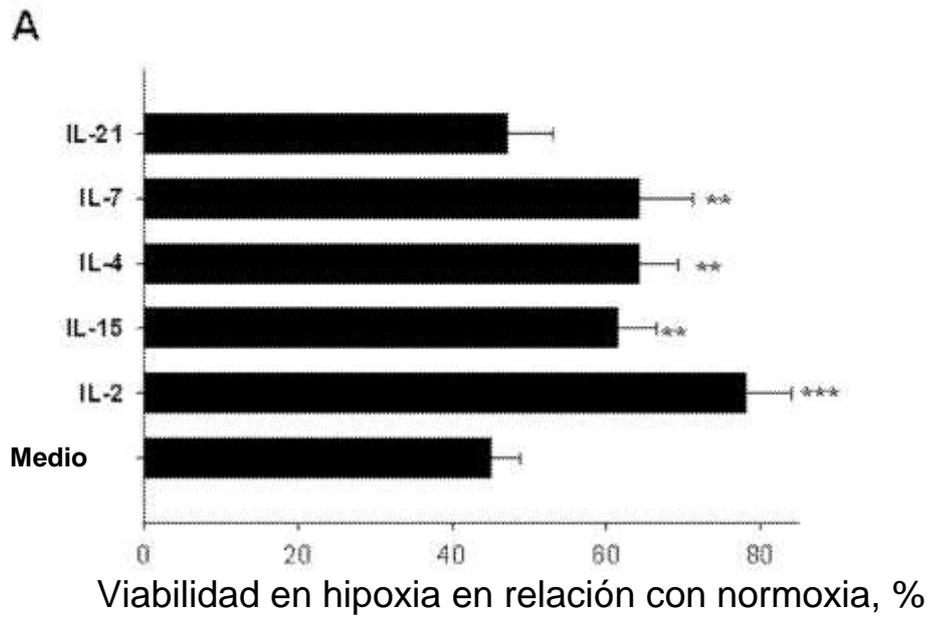


Figura 4

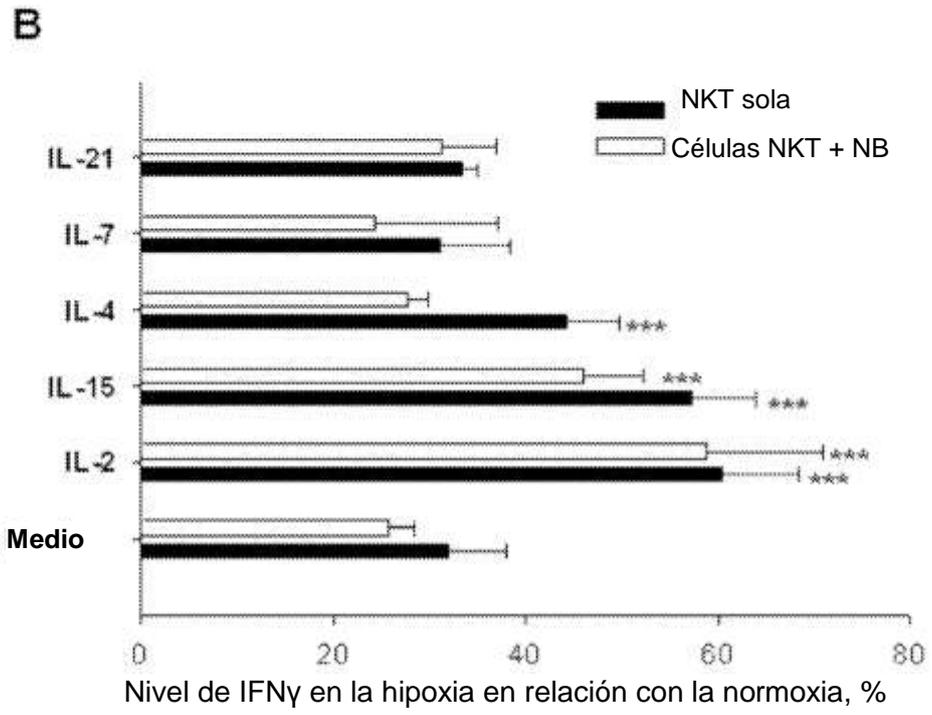


Figura 4

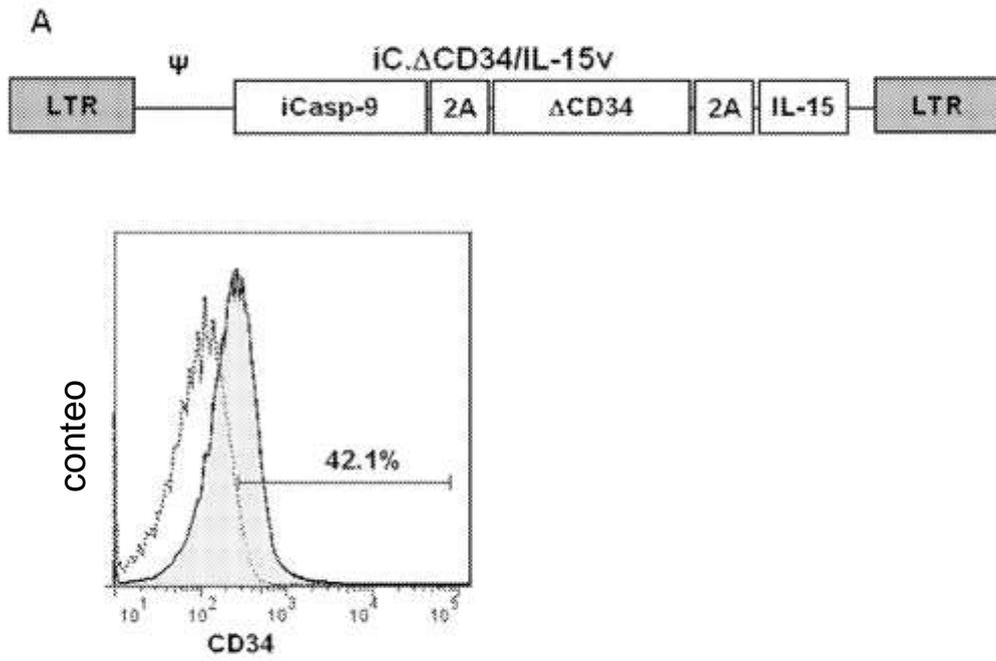


Figura 5

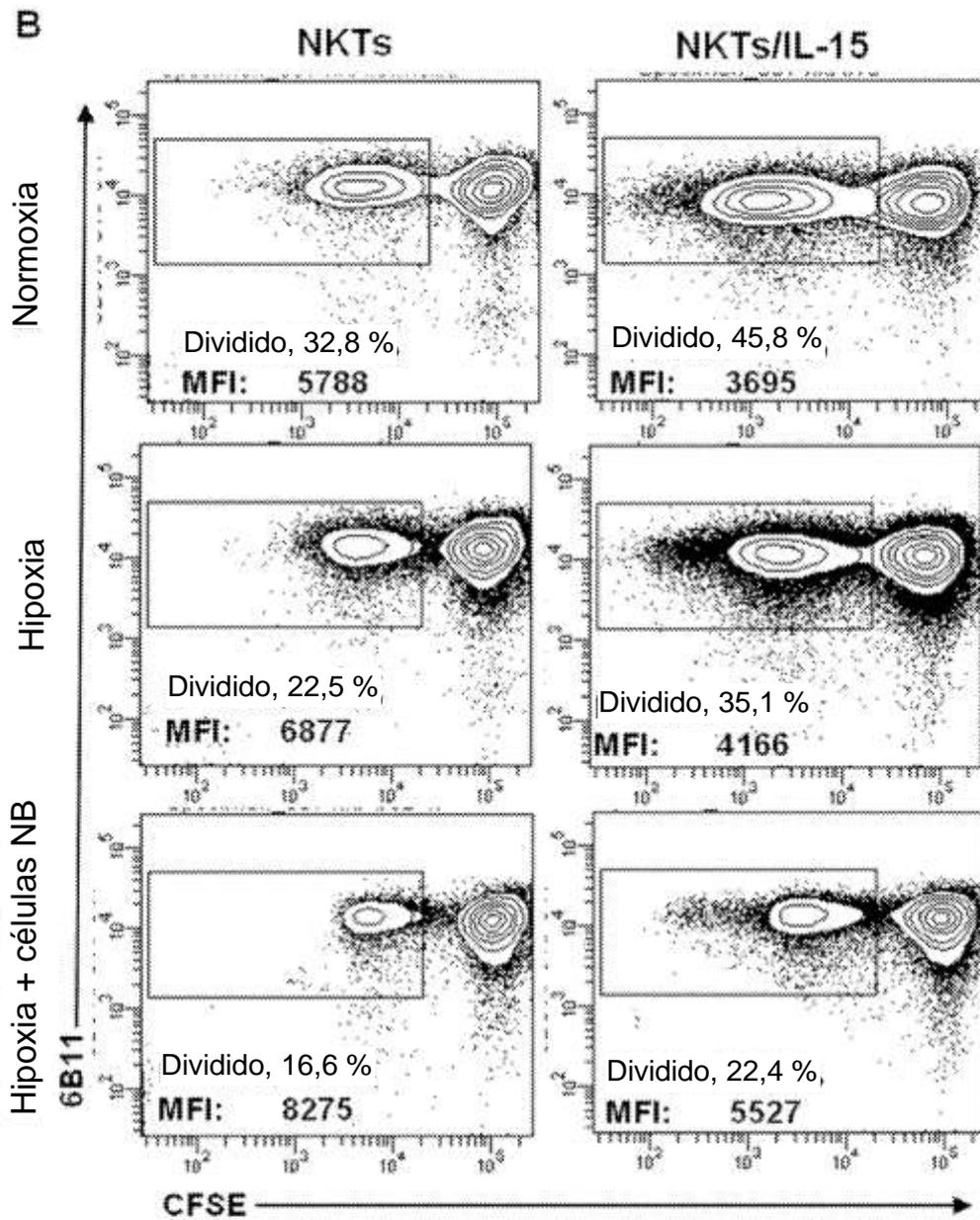


Figura 5

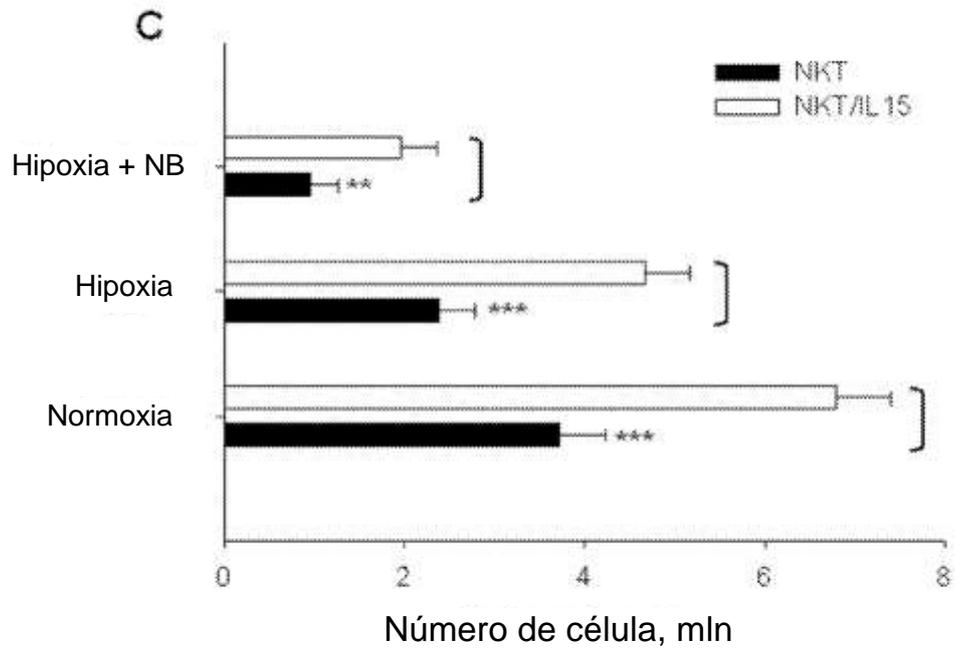


Figura 5

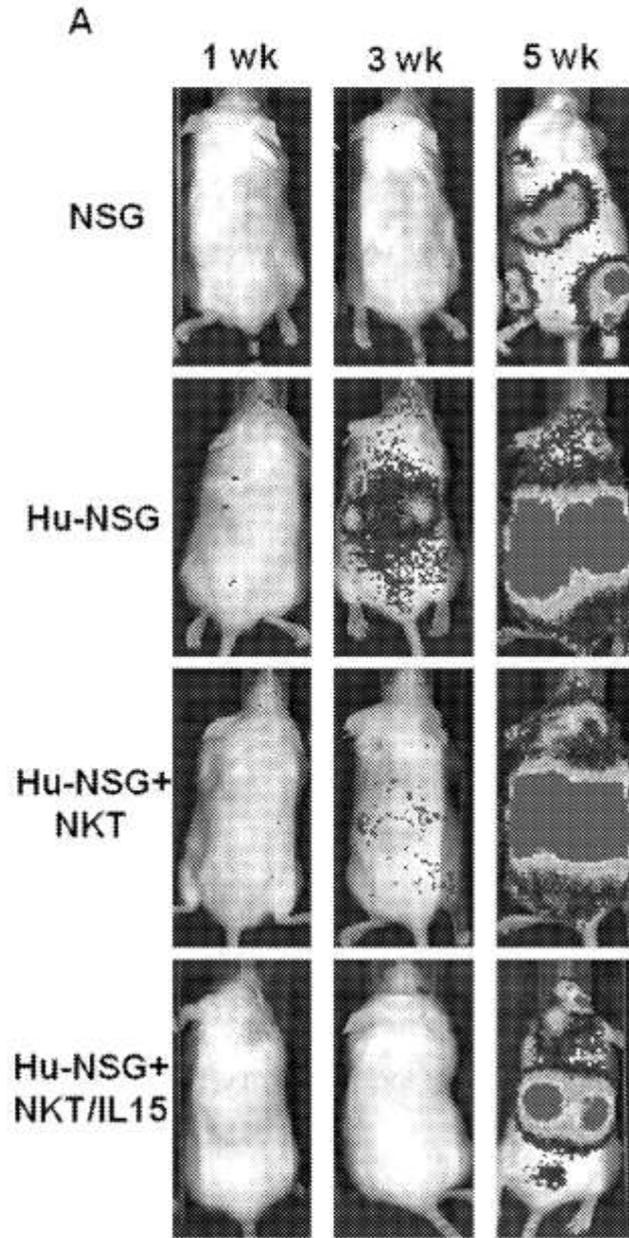


Figura 6

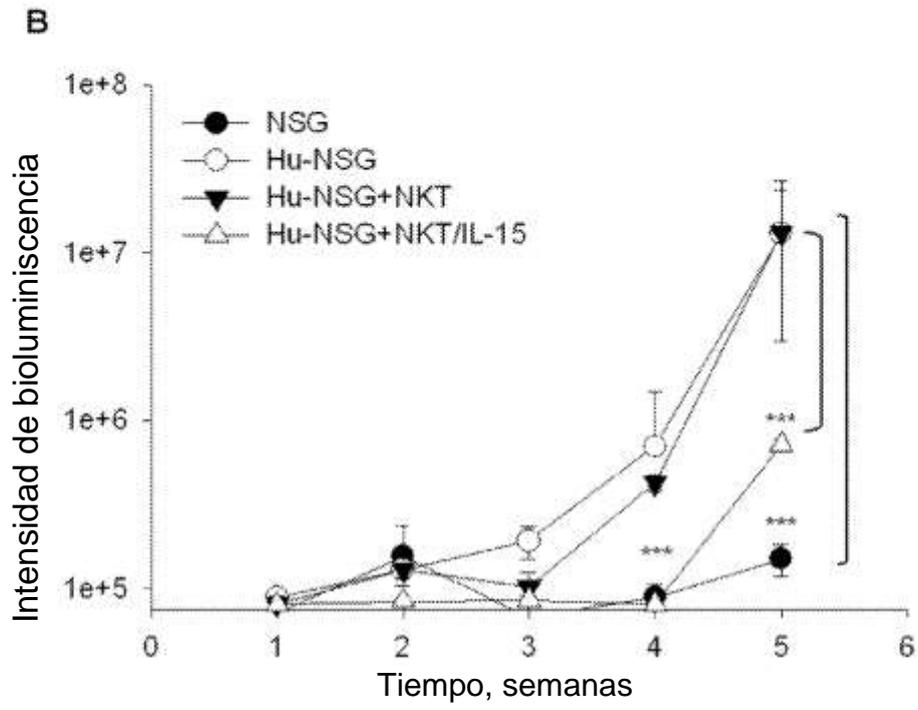


Figura 6

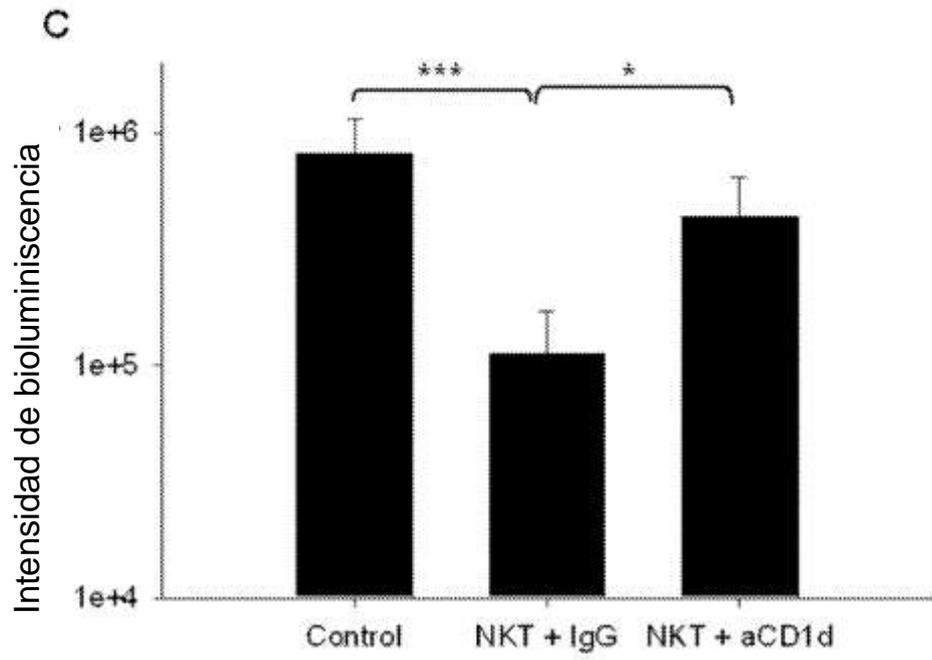


Figura 6

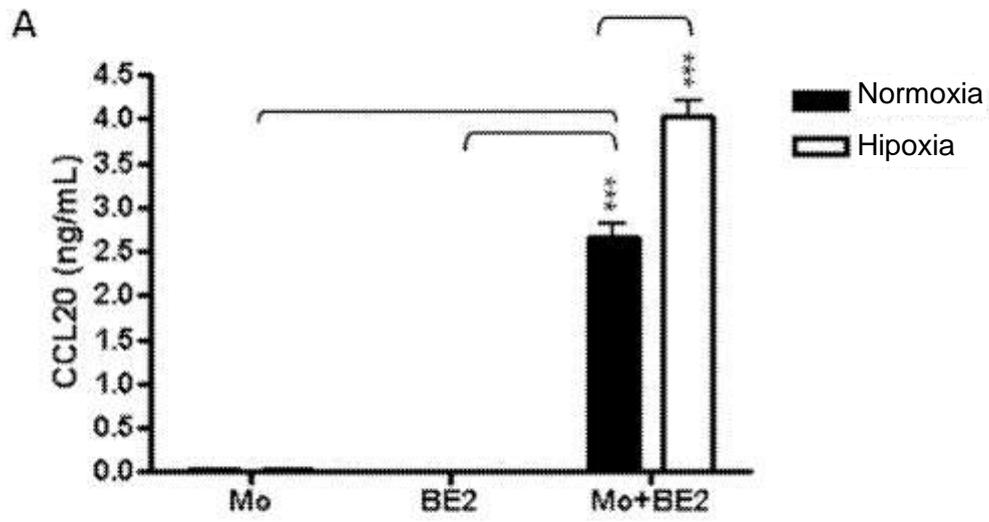


Figura 7

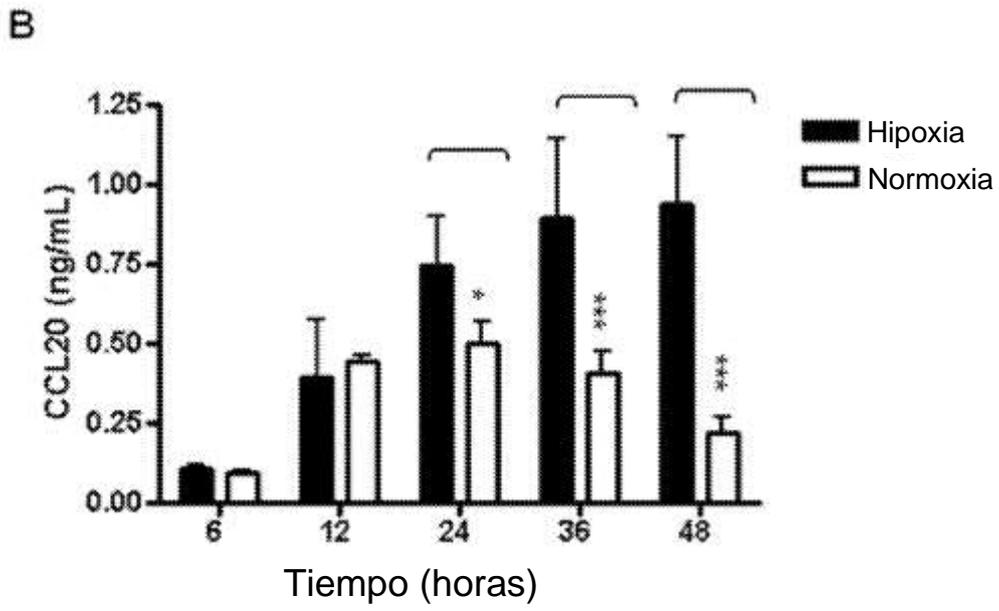


Figura 7

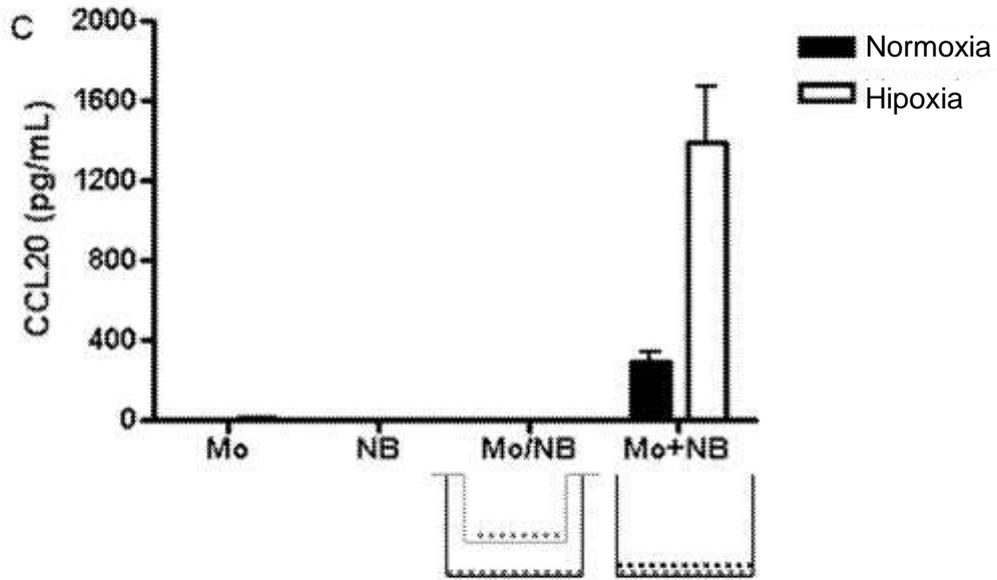


Figura 7

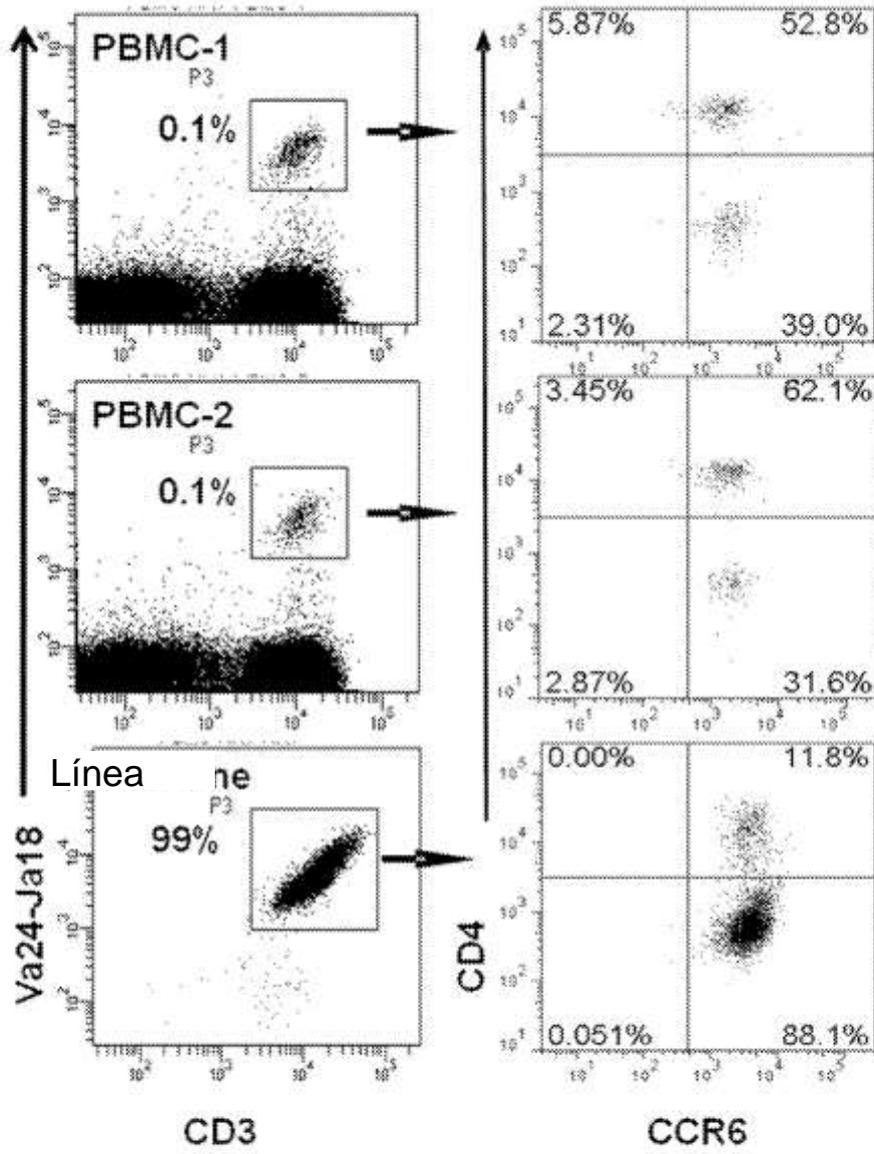


Figura 8

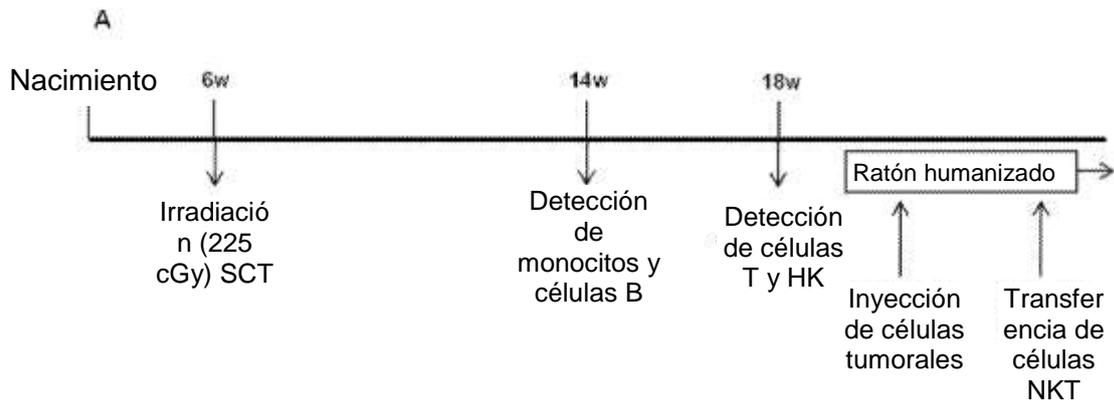


Figura 9

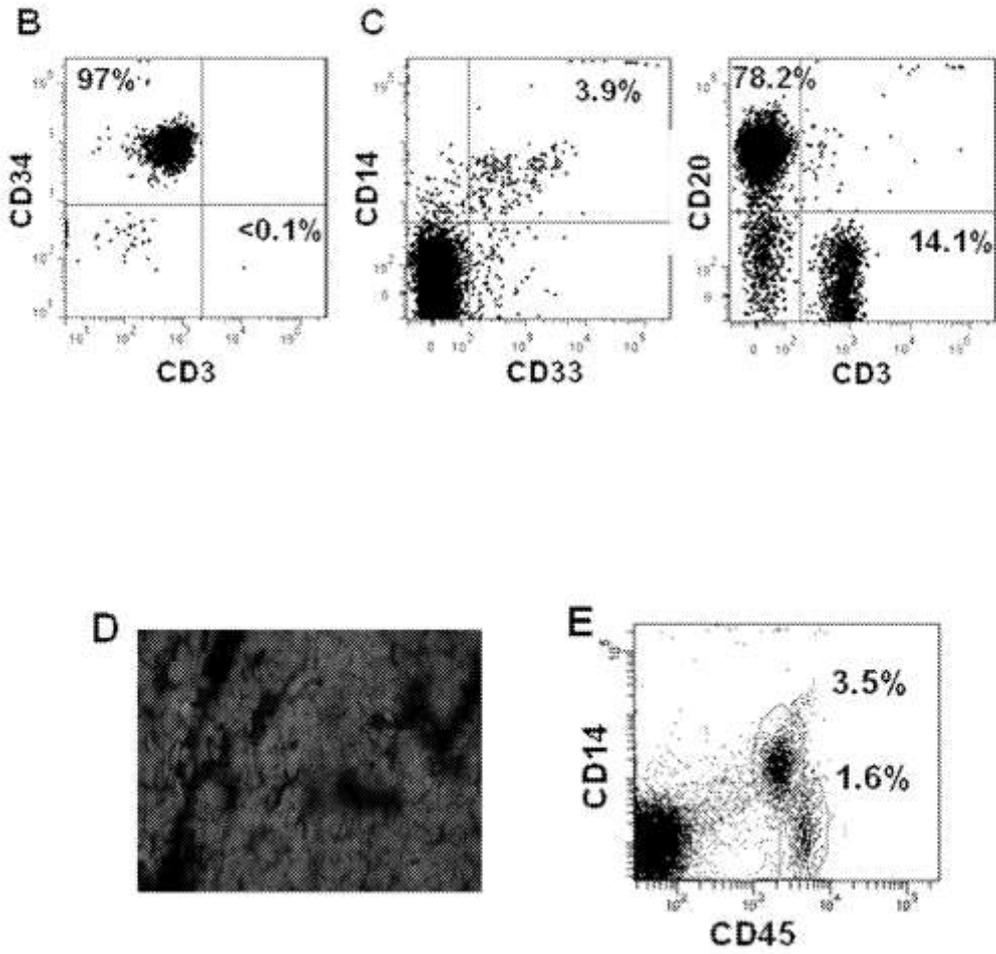


Figura 9

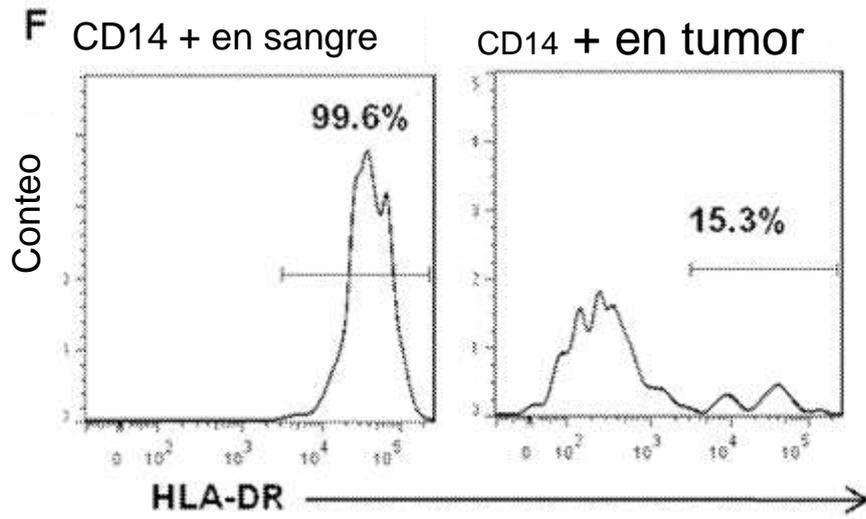


Figura 9

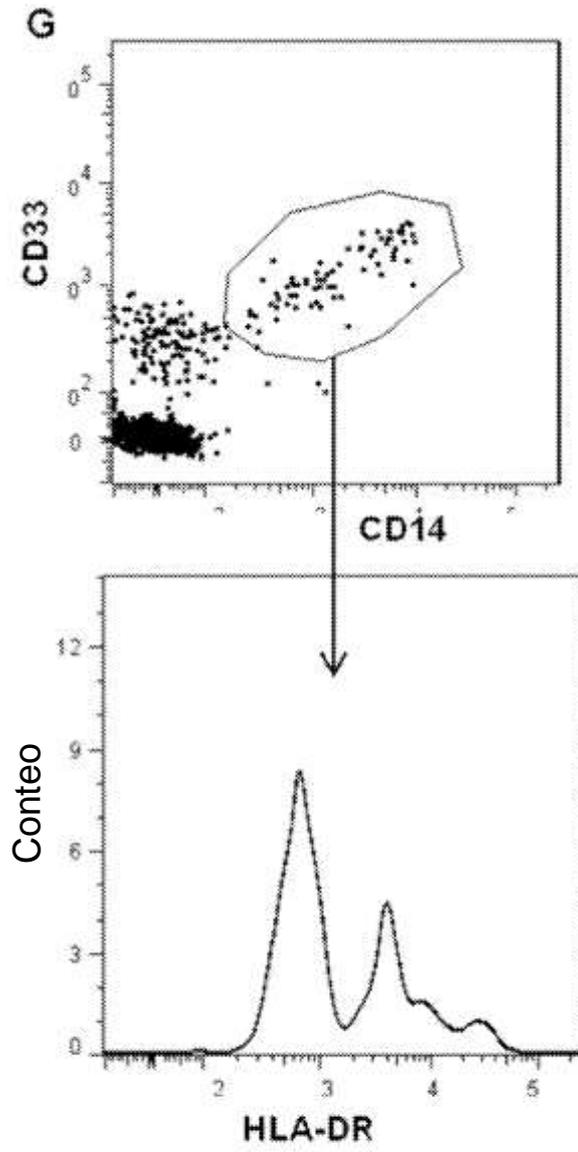


Figura 9

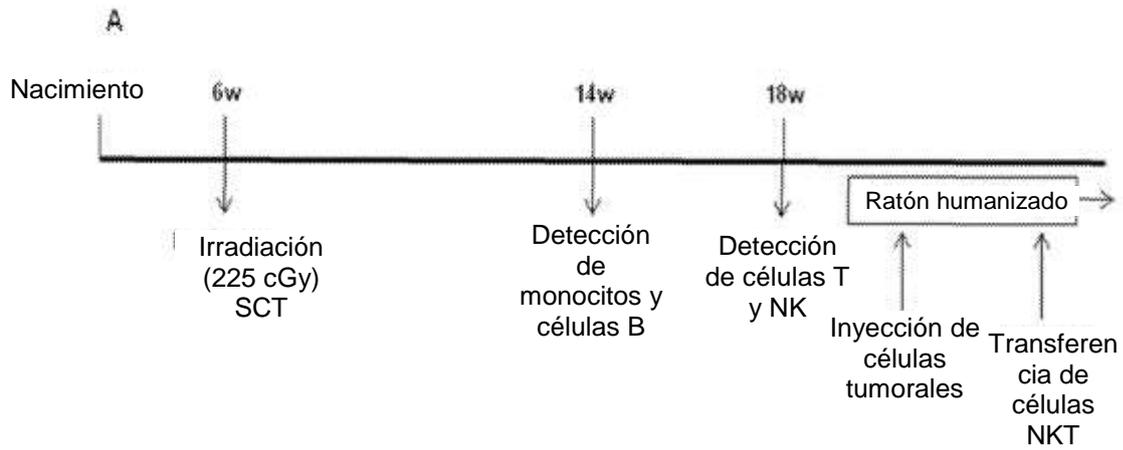


Figura 10

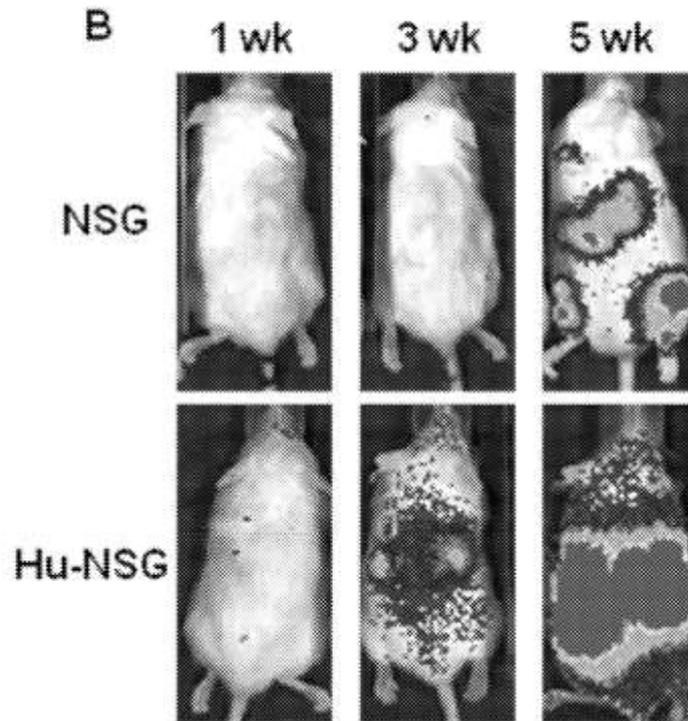


Figura 10

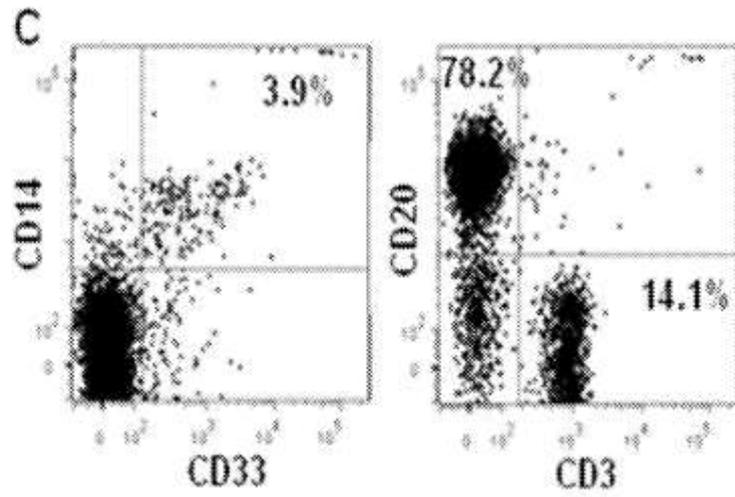


Figura 10

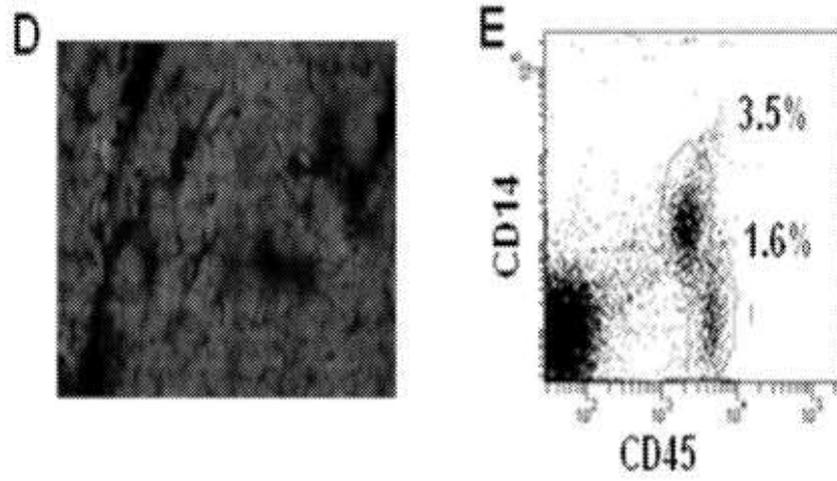


Figura 10

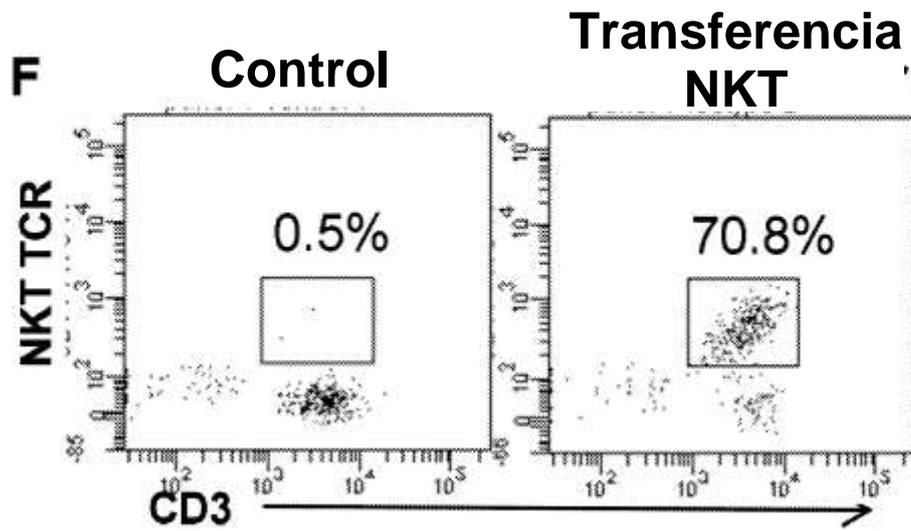


Figura 10

A

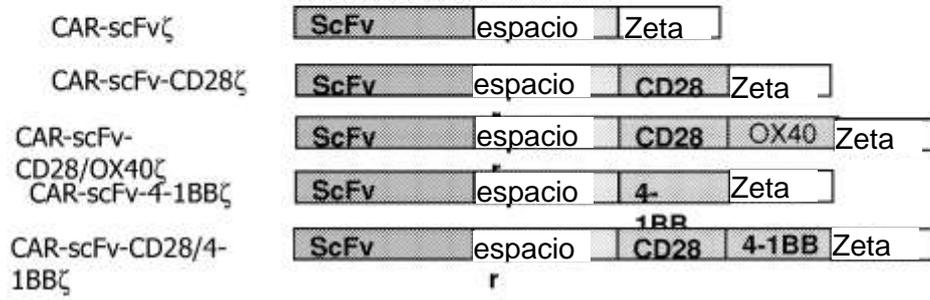


Figura 11

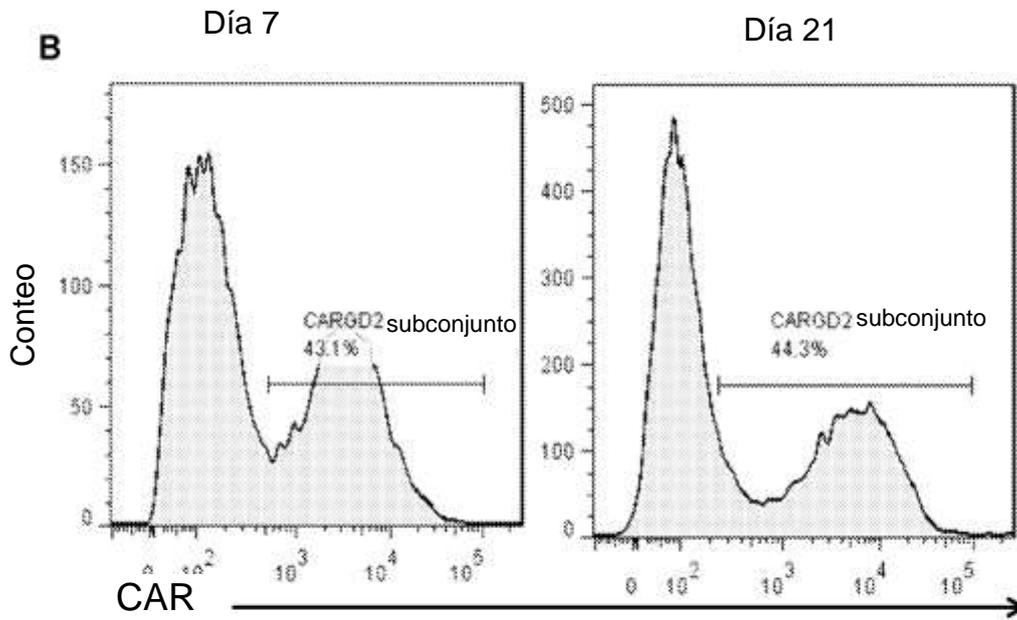


Figura 11

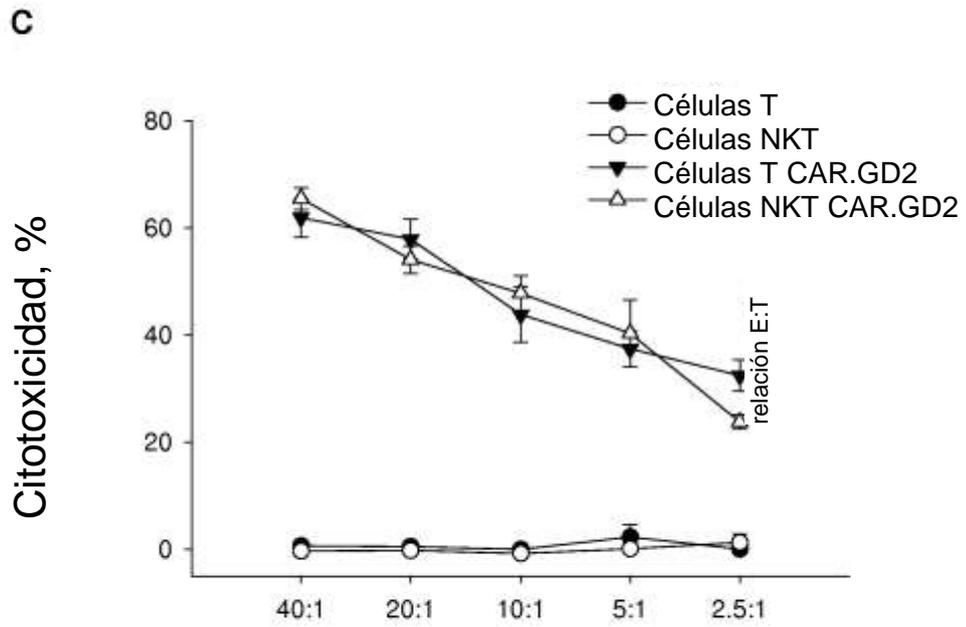


Figura 11

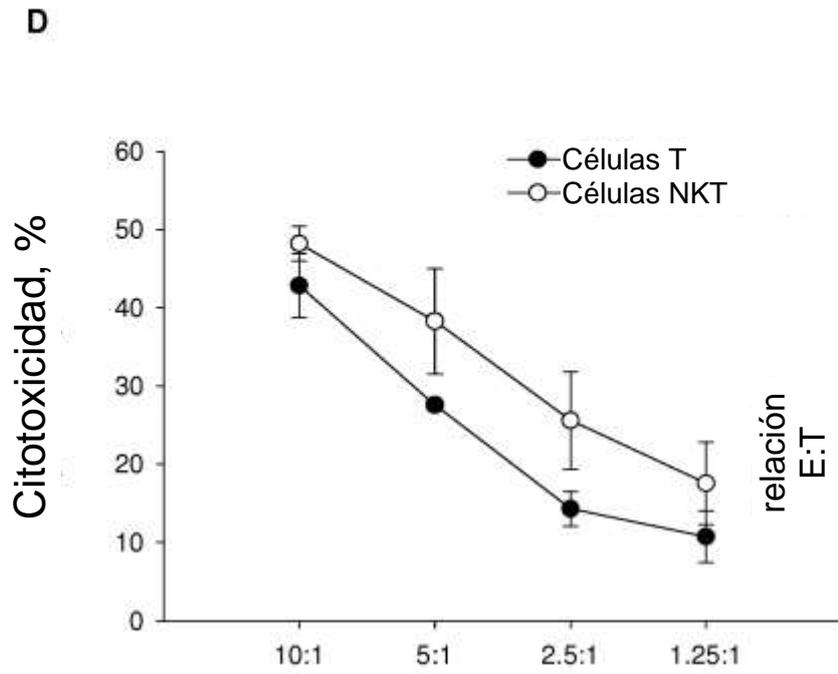
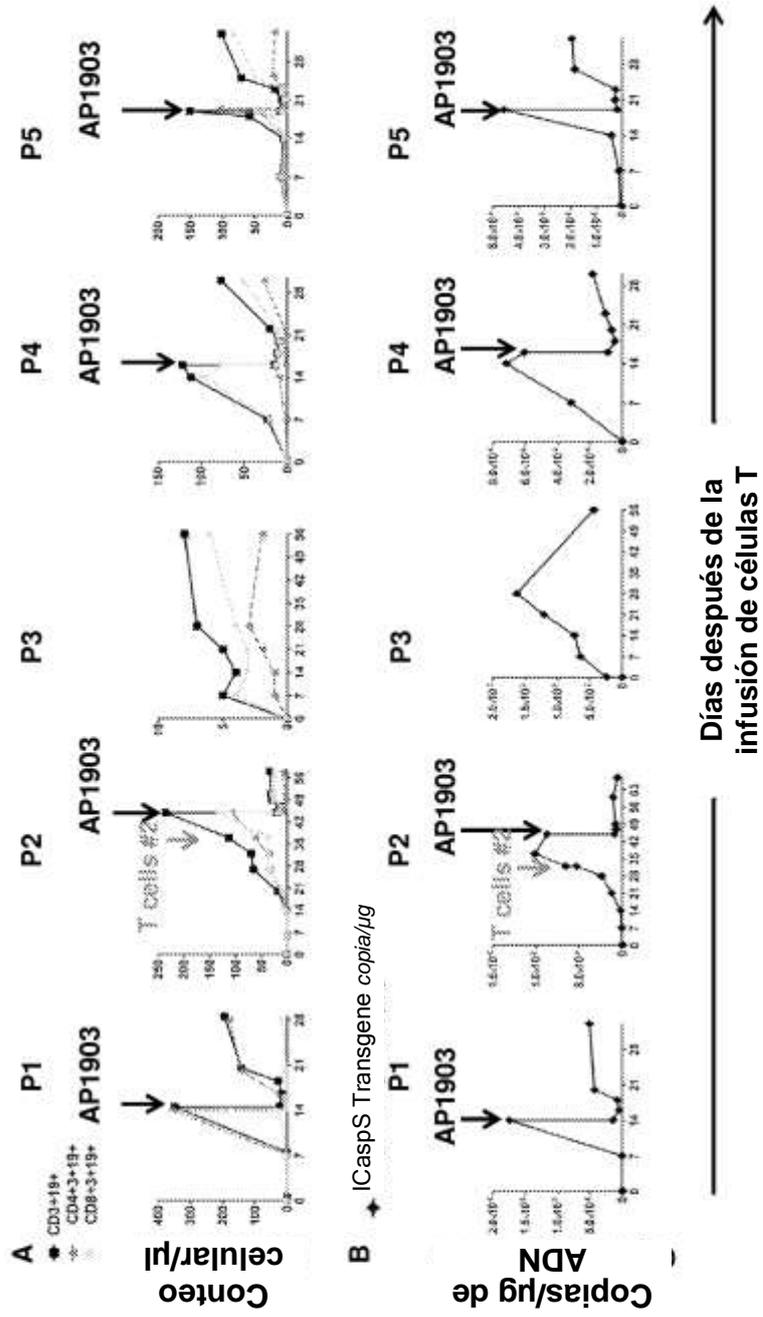


Figura 11



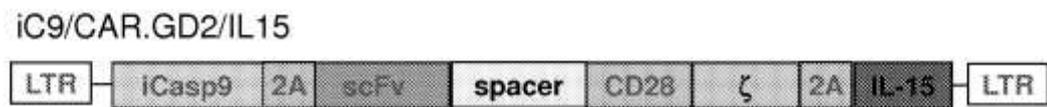
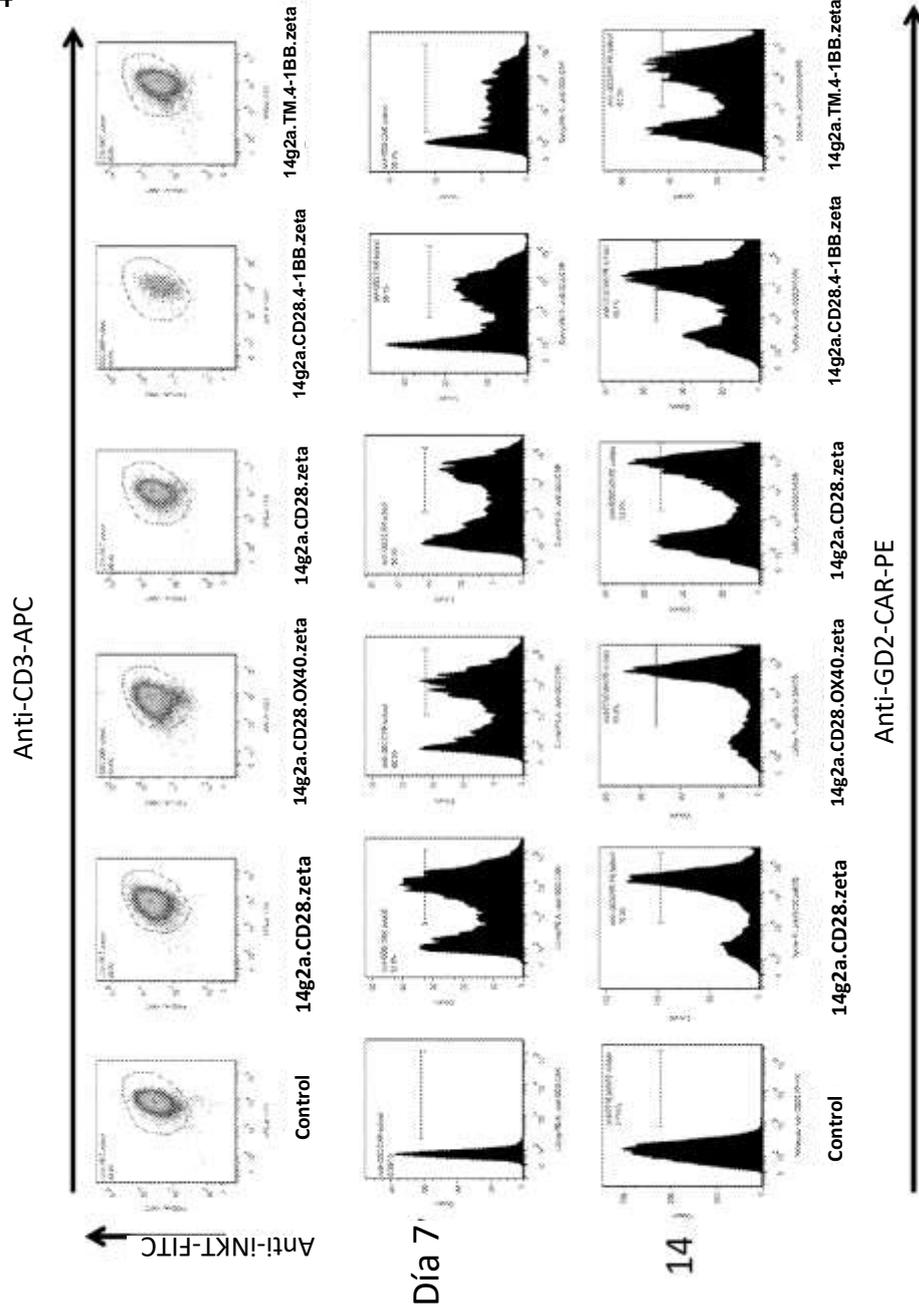
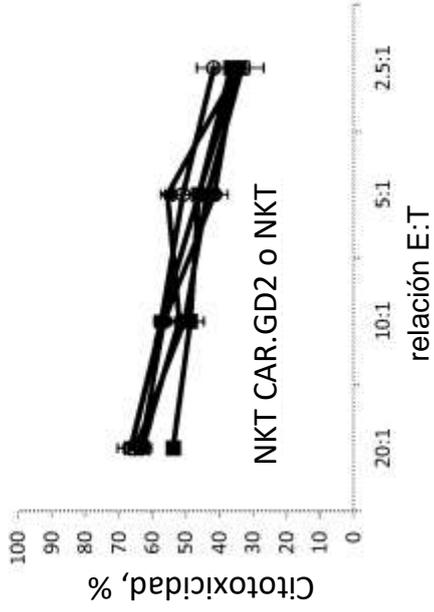


Figura 13

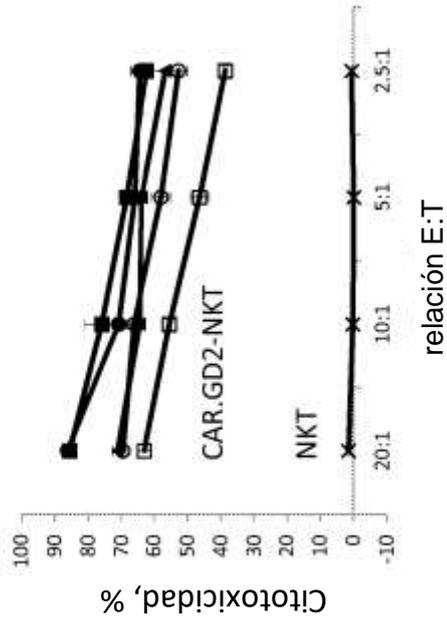
Figura 14



TAM M2 positivas a CD1d^{negativas} a GD2 + aGalCer



Células NB negativas^a CD1d^{positivas} a GD2



Células NB negativas^a CD1d^{negativas} a GD2

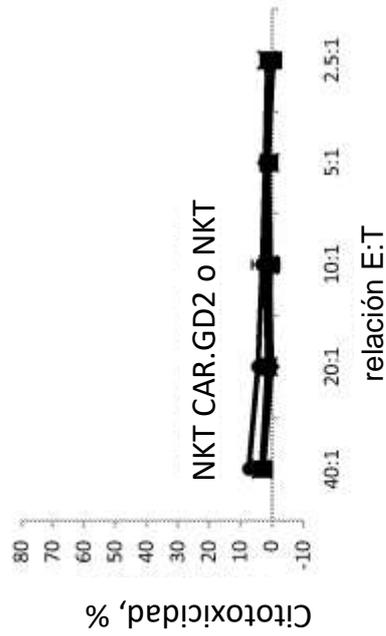


Figura 15

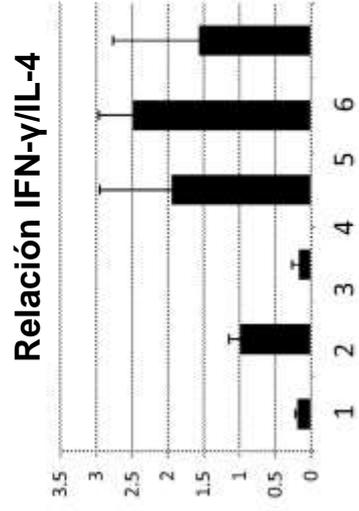
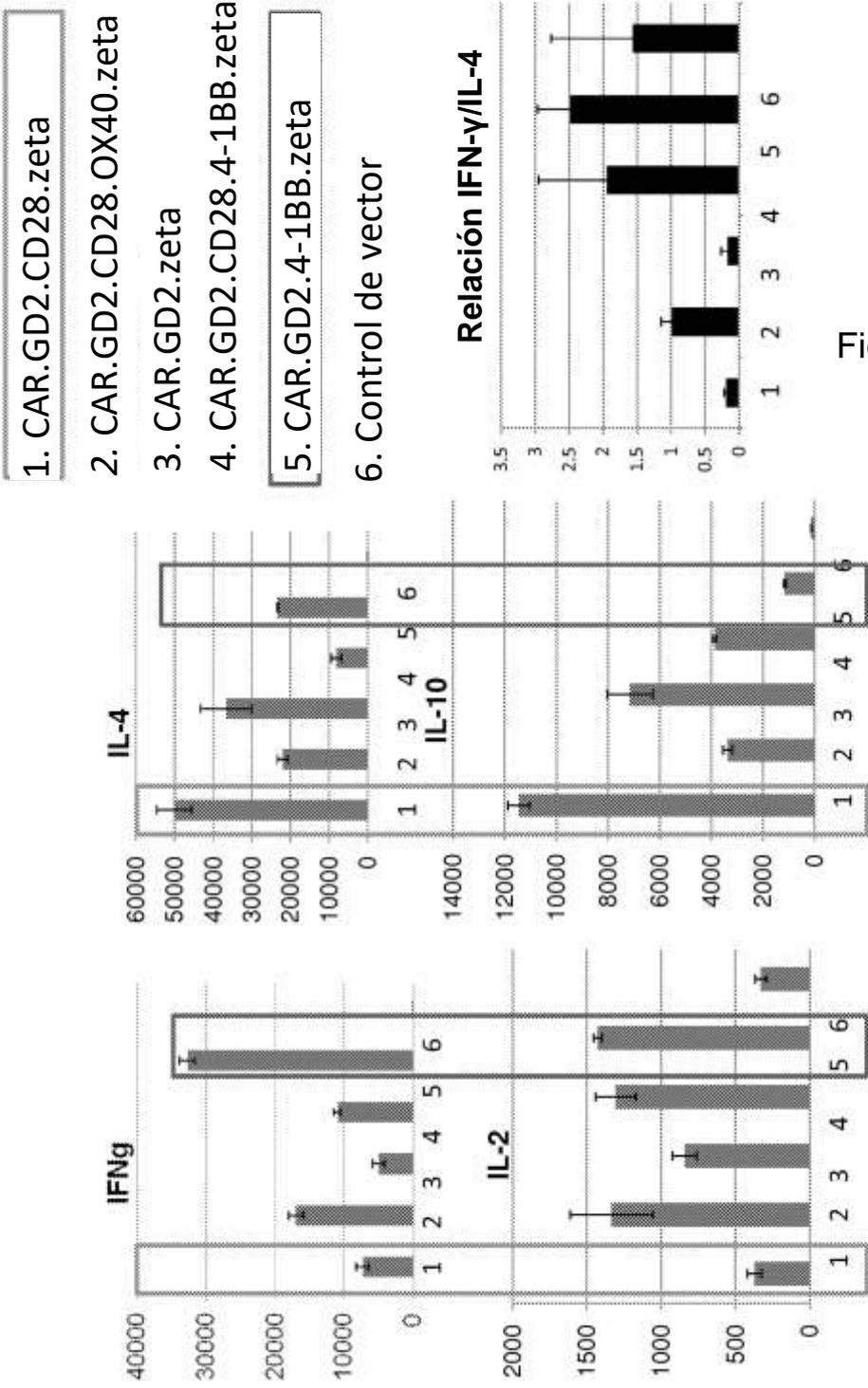


Figura 16

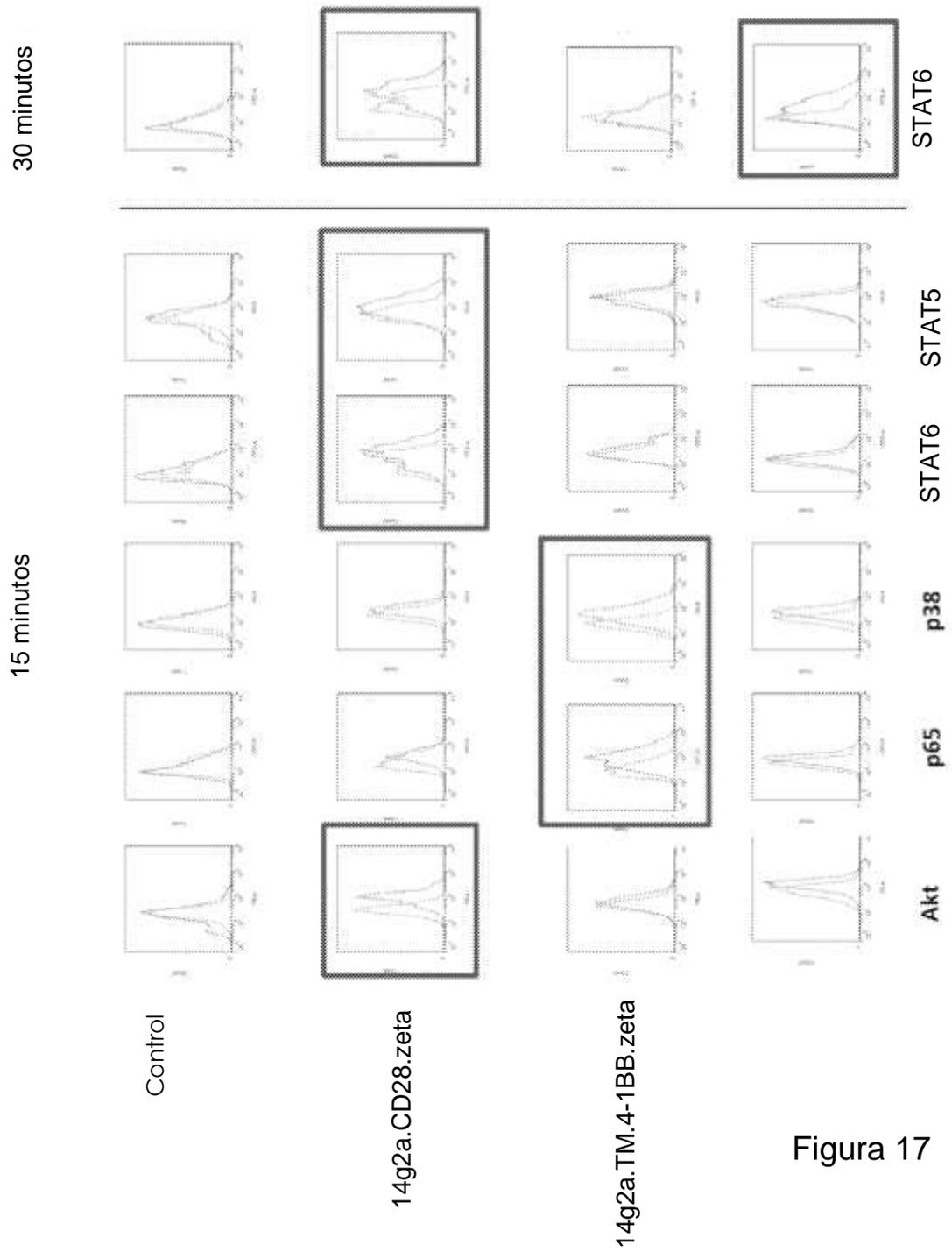


Figura 17

Figura 18

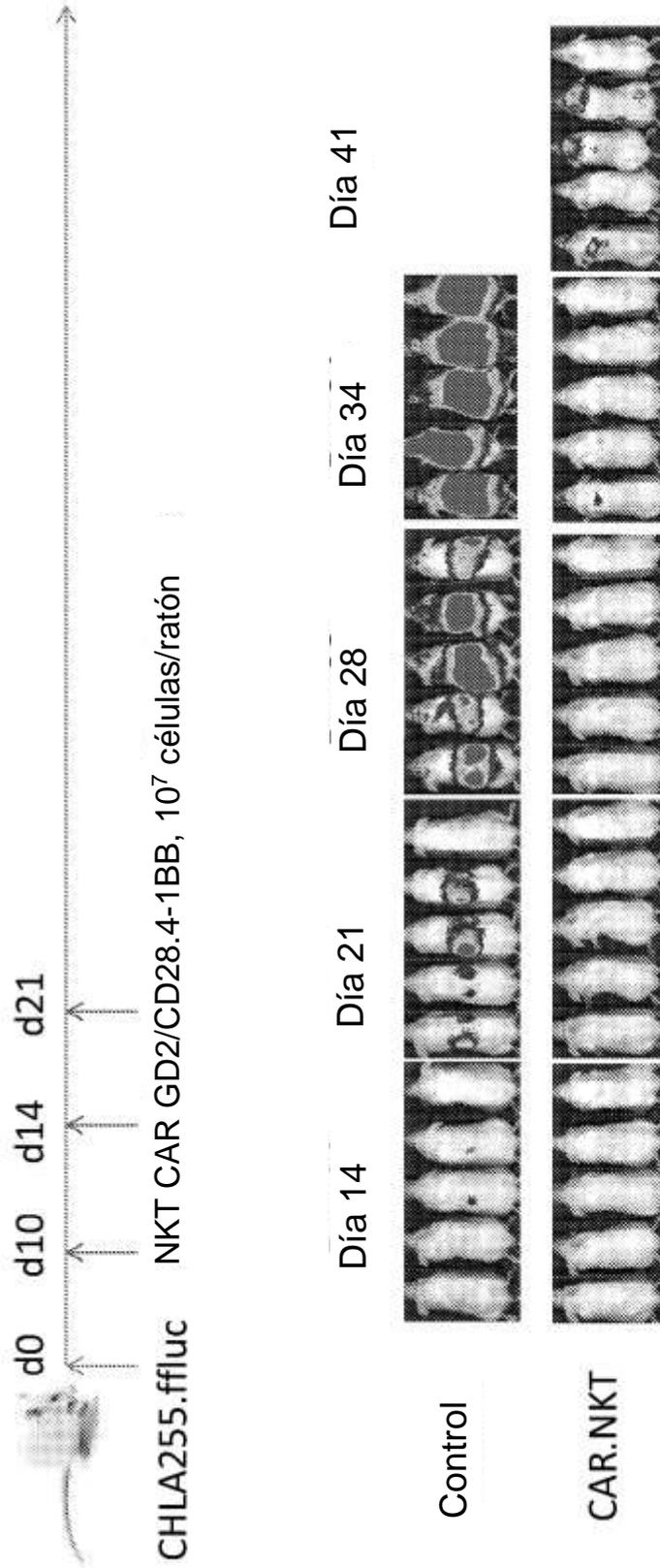


Figura 19

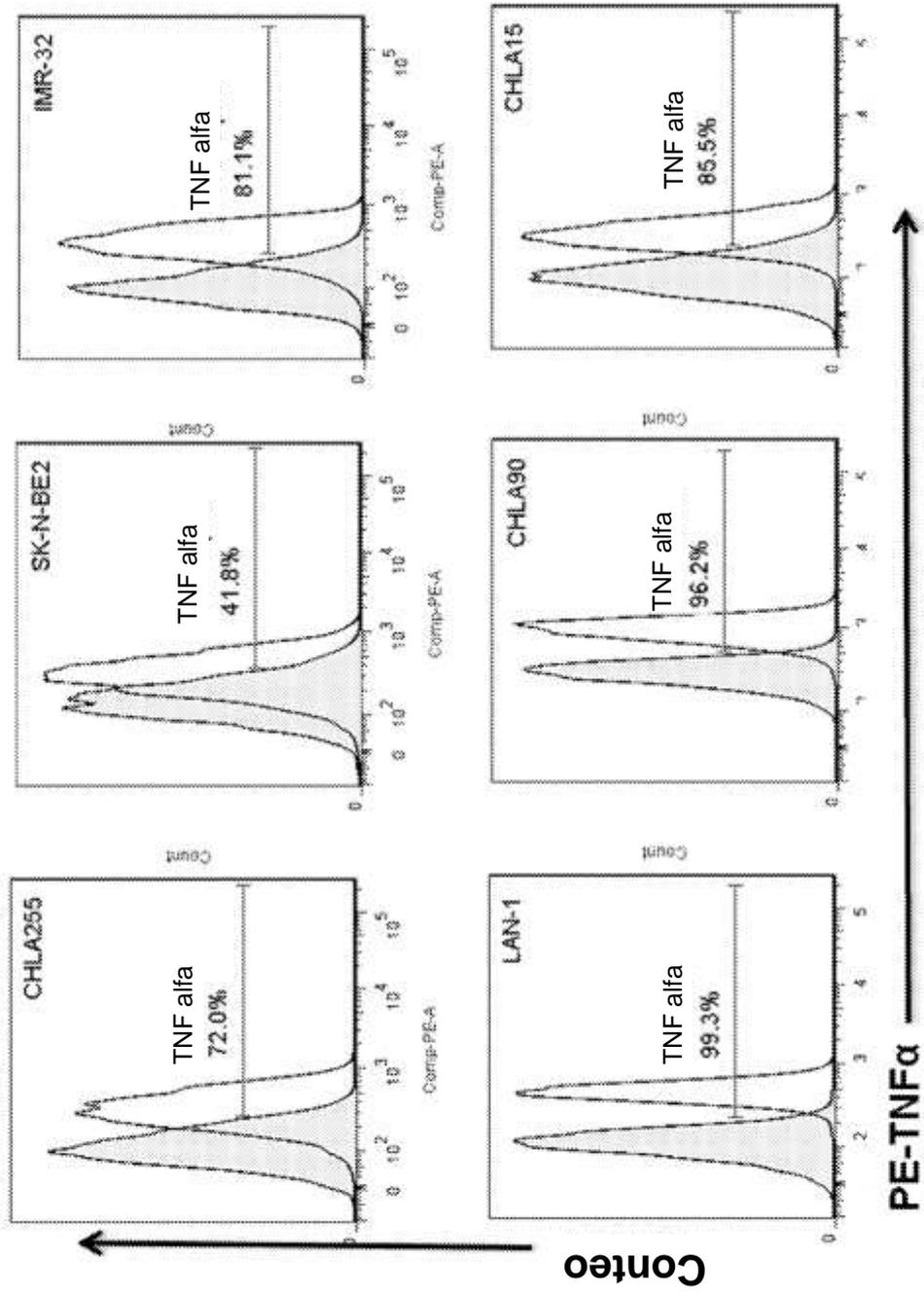
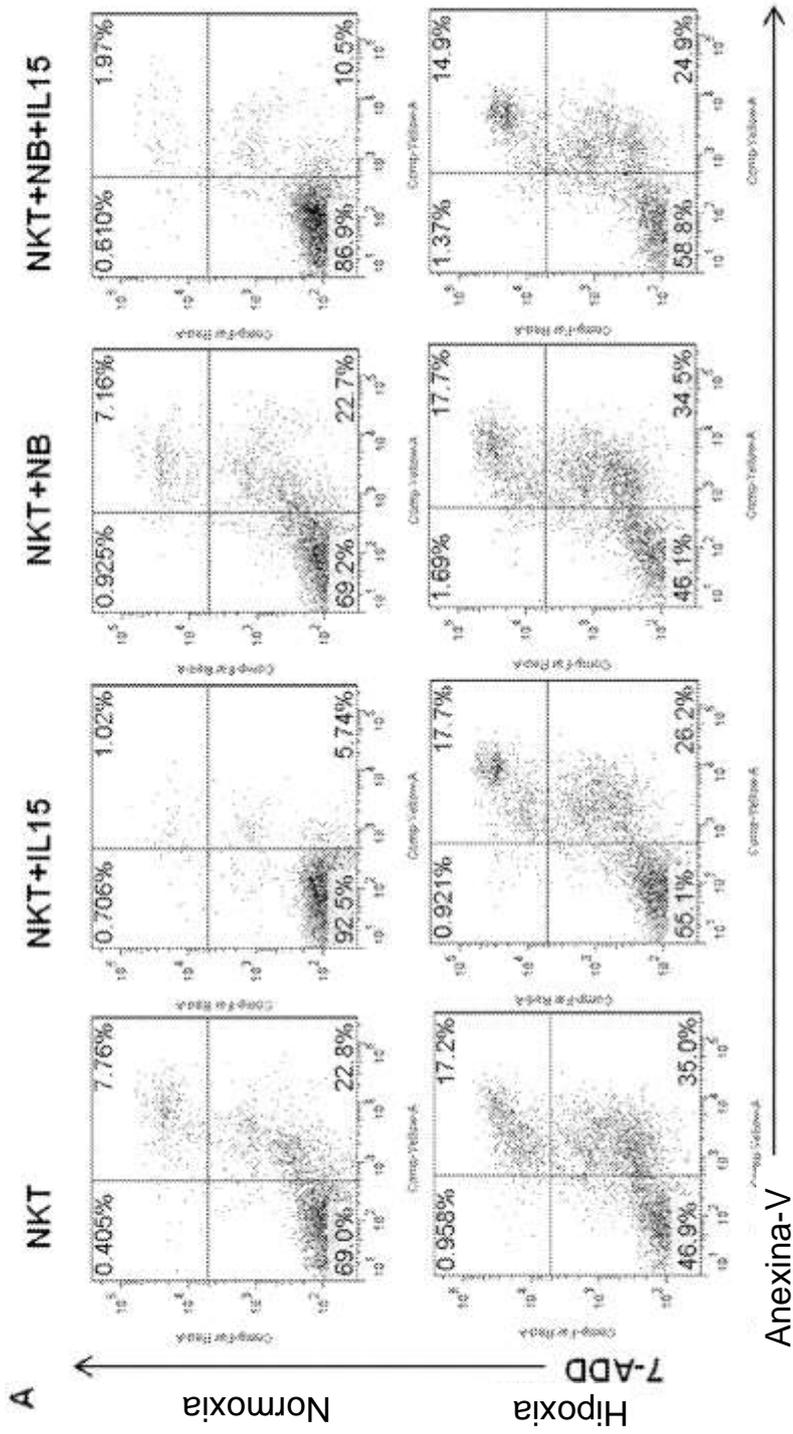


Figura 20



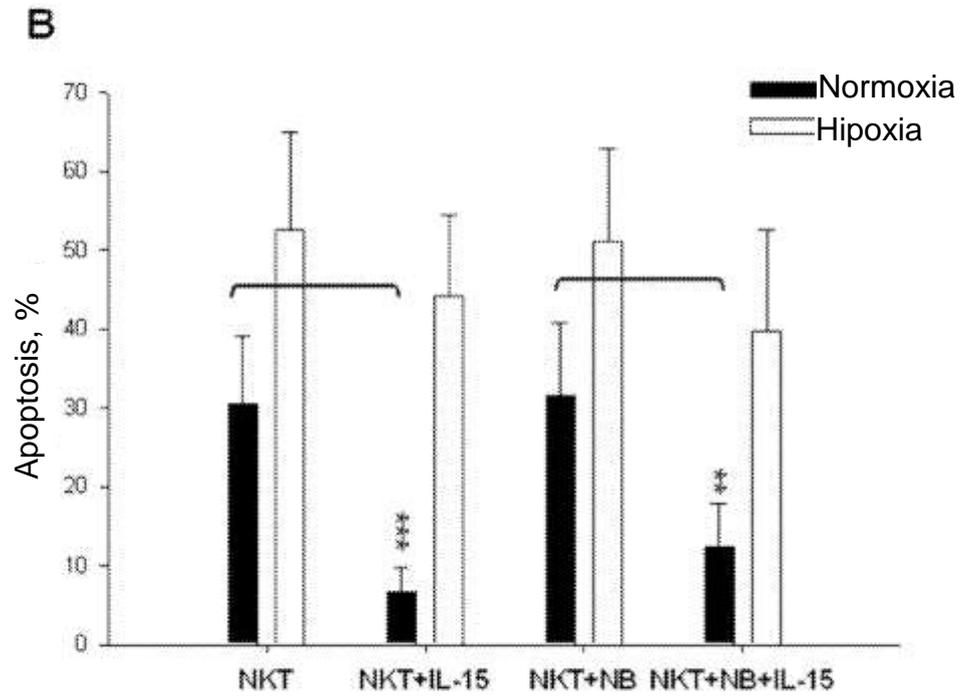


Figura 20