

MÉTODO PARA LA EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T Y CÉLULAS NK EN TERAPIAS DE TRANSFERENCIA ADOPTIVA

CAMPO DE LA TÉCNICA

- 5 La presente invención se relaciona con el campo de la Biotecnología y la Inmuno-oncología, especialmente con un método para la expansión y diferenciación de linfocitos T y células NK con el fenotipo de memoria y su uso en la transferencia adoptiva de células para la terapia del cáncer.

ANTECEDENTES

- 10 La Interleucina 2 (IL2) fue la primera citocina en ser molecularmente caracterizada e inicialmente mostró su capacidad de estimular el crecimiento y la expansión de las células T y NK (Morgan y cols., 1976, Science, 193 (4257):1007-1008). La IL2 fue aprobada para uso clínico en cáncer en 1992 pero la descripción precisa de la biología de su receptor está aún en estudio (Rosenberg, 2014, J. Immunol., 192(12):5451-8; Smith, 2006, Medical
- 15 Immunology, 1476 (9433):5-3). La administración sistémica de IL2 a altas dosis es utilizada como inmunoterapia en cáncer y ha producido respuestas duraderas en pacientes de melanoma y carcinoma de células renales pero solo en una pequeña fracción de pacientes. Además, este tratamiento induce una toxicidad significativa lo cual limita su relevancia clínica (Atkins, 2006, Clin. Cancer Res., 12:2353-2358).
- 20 La IL2 interactúa con tres tipos de receptores (IL2R) en los linfocitos T y células NK. El receptor de baja afinidad ($K_d \sim 10^{-8}M$) que solo contiene el CD25 que es la subunidad alfa ($IL2R\alpha$). El receptor de IL2 dimérico de afinidad intermedia ($IL2R\beta\gamma$) ($K_d \sim 10^{-9}M$) que está formado por las subunidades CD122 o cadena $IL2R\beta$ y el CD132 o cadena $IL2R\gamma$ y el receptor de alta afinidad ($IL2R\alpha\beta\gamma$) que contiene las tres subunidades $IL2R\alpha$, $IL2R\beta$ y $IL2R\gamma$. Solo el
- 25 $IL2R\beta\gamma$ y el $IL2R\alpha\beta\gamma$ son funcionales y capaces de transducir señales a las células (Stauber y cols., 2005, PNAS, 103(8):2788-2793; Wang, 2005, Science, 310(18):1159-1163). $IL2R\beta$ e $IL2R\gamma$ están presentes en las células efectoras del sistema inmune, mientras que la expresión constitutiva de la subunidad $IL2R\alpha$ en las células T reguladoras (Treg), hace que estas expresen el $IL2R\alpha\beta\gamma$ y por tanto tienen un uso preferencial de la IL2 *in vivo*. (Malek, 2008, Annu. Rev. Immunol., 26:453-79). Hasta hoy, numerosos trabajos han demostrado que
- 30 la baja eficacia de la terapia con IL2 sistémica a altas dosis, se debe precisamente a la expansión de las células Tregs que a su vez inhiben la respuesta efectora antitumoral (Choo Sim y cols., 2014, J. Clin. Invest., 124(1):99-110).
- En el empeño de mejorar la eficacia de la terapia con IL2, varios estudios mutacionales
- 35 demuestran que es posible mutar la IL2 ya sea para favorecer o afectar su interacción con cada una de las subunidades del receptor, basado en la expresión diferencial de las diferentes

subunidades del IL2R en las células linforides (Skrombolas y Frelinger, 2014, Expert. Rev. Clin. Immunol., 10(2):207-217). Los primeros estudios se enfocaron en aumentar la afinidad de la IL2 por el IL2R α (Rao y cols., 2003, Protein Engineering, 16(12):1081-1087). A pesar de que no era evidente en el momento en que este trabajo se desarrolló, hoy en día se sabe que la estrategia de incrementar la afinidad por IL2R α induce una expansión preferencial de las Tregs, no deseable en la terapia antitumoral. Recientemente Levin y colaboradores en 1992 obtuvieron mutantes de IL2 afinidad incrementada por la subunidad IL2R β , la cual activa preferencialmente las células efectoras que sobre-expresan el IL2R β (IL2R β y). En particular, la obtención de una variante llamada superkina H9 resultó ser más antitumoral y menos tóxica que la IL2 nativa (Levin y cols., 2012, Nature, 484(7395): 529-33). Carmenate y cols., reportaron la introducción de cuatro mutaciones en la secuencia de la IL2 humana que reducen eficientemente la afinidad por el IL2R α sin afectar la interacción con el IL2R β y. Esta muteína no expandió la población de células Tregs cuando se administró *in vivo* y fue más efectiva y menos tóxica que la IL2 nativa modelos de ratón (Carmenate et. al., 2013, J. Immunol., 190(12):6230-8). Otras dos muteínas de IL2, nombradas F42K y R38A tienen además muy reducida la afinidad de unión por IL2R α y mostraron ser menos efectivas en estimular las Treg *in vitro* y a su vez expandieron de manera eficiente a células LAK (Heaton et. al., 1994, Ann. Surg. Oncol., 1(3):198-203).

Con el objetivo de mejorar la eficacia de la terapia con IL2 a altas dosis, otros trabajos se han concentrado en el incremento de su tiempo de vida medio a través de la pegilación o su fusión a la porción Fc de anticuerpos (Acs) (Zhu y cols., 2015; Cancer Cell, 27:498-501; Charych y cols., 2016, Clin. Cancer Res., 22(3):680-90).

La transferencia adoptiva de células (ACT, por sus siglas en inglés), se define como el método de tratamiento en el cual se extraen de un donante las células del sistema inmune, se cultivan y/o manipulan *in vitro* y luego se administran al paciente para el tratamiento de una enfermedad. Para el tratamiento del cáncer, las células que se emplean en la terapia ACT son generalmente linfocitos (Gattinoni y cols., 2006, Nat. Rev. Immunol., 6:383-393). En esta terapia tres modalidades principales de tratamiento prevalecen en la actualidad: a) el empleo *ex vivo* de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs); b) el uso de células T o NK modificadas genéticamente para expresar un receptor quimérico un TCR con mayor afinidad o aidez por péptidos derivados de antígenos tumorales y c) el empleo de células T o NK ingenierizadas para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico por antígenos tumorales. Estas dos últimas estrategias se combinan frecuentemente con la ingeniería genética de los linfocitos transferidos para estimular sus funciones efectoras *in vivo*, por ejemplo, la ingeniería de la secreción de citocinas relevantes (Cassian Y., 2018, Curr. Opin. Immunol., 51:197-203).

A pesar de que la transferencia de células T efectoras reactivas al tumor puede causar respuestas objetivas, hay fuertes evidencias tanto en humanos como en animales que demuestran que las células T con un fenotipo de memoria central son mediadores superiores de la respuesta antitumoral (Klebanoff y cols., 2005, PNAS, 102(27):9571-6). Las células de memoria central son células que han experimentado activación antígeno-específica (CD44+) y que conservan la expresión de CD62L, la cual es necesaria para la migración hacia los nódulos linfáticos periféricos (Ridell y cols., 2014, Cancer J., 20(2):141-144). Las células T de memoria central persisten por más tiempo probablemente debido a su mayor capacidad de proliferar y secretar citocinas como la IL2, después del re-encuentro con el antígeno (TCF1+).

Por el contrario, las células T efectoras son células que han tenido encuentros con el antígeno y tienen una significativa disminución de la expresión del CD62L una mayor expresión de marcadores inhibitorios (PD1, TIM3 y LAG3) y una menor capacidad de secretar citocinas, tienen una mayor propensión a convertirse en células exhaustas *in vivo* (Kishton y cols., 2017, Cell. Metab., 26(1):94-109; Klebanoff y cols., 2005, PNAS, 102(27):9571-6). Por tanto, para lograr mejores terapias de ACT es necesario desarrollar protocolos para el cultivo de células T que favorezcan la diferenciación de los linfocitos hacia células de memoria central.

La IL2 promueve la activación y expansión *in vitro* de los linfocitos T y las células NK, por lo ha tenido un rol principal en el desarrollo de las terapias de ACT en cáncer. Las primeras estrategias descritas, emplearon la IL2 para generar células LAK, la co-administración de LAK y altas dosis de IL2 sistémicas, incrementaron la respuesta clínica de la monoterapia. En otra estrategia, se usaron altas concentraciones de IL2 para expandir a los TILs del extracto tumoral. Los TILs experimentan una rápida expansión en presencia de IL2 combinada con la estimulación *in vitro* del TCR. Los TILs expandidos se administran al paciente junto con un régimen de altas dosis de IL2 sistémica, dicho régimen contribuye a sostener la persistencia *in vivo* de las células transferidas (Rosenberg, 2014, J. Immunol., 192 (12) 5451-8). Una estrategia más reciente para incrementar la eficacia de las altas dosis de IL2 sistémicas, como adyuvante de la terapia ACT, desarrolló un método basado en la ortogonalización del par ligando-receptor, utilizando una IL2 mutada que se une específicamente a su receptor mutado pero no a su contraparte nativa. Con esta estrategia, los autores redirigieron la señalización de la IL2 hacia las células T ingenierizadas usando el par IL2-IL2R ortogonal, lo cual limita la toxicidad indeseada y además fue efectiva en reducir el volumen tumoral e incrementar la supervivencia al utilizar la terapia ACT en un modelo de cáncer en ratón (Sokolosky y cols., 2018, Science, 359 (6379):1037-1042).

A pesar del papel de la IL2 para modular la respuesta de células T asociada a la ACT, su efecto en la expansión/diferenciación de las células T de memoria no ha sido completamente dilucidado. Las células expandidas *in vitro* en presencia de IL2 poseen fuertes propiedades efectoras, y muestran además afectada su persistencia y supervivencia *in vivo*. La IL2

promueve la activación y proliferación de las células T de una forma única y efectiva sin embargo, también es responsable de favorecer el mecanismo de muerte inducida por activación (Spolski y cols., 2018, Nat. Rev. Immunol., (18) 648-659). Varios estudios muestran que reduciendo la señalización de la IL2 durante la activación *in vitro* se pudiera favorecer el desarrollo de células T CD8+ de memoria. La reducción de la señal de IL2 se ha llevado a cabo principalmente disminuyendo las concentraciones de IL2 o reduciendo el tiempo de exposición durante el cultivo *in vitro*. Otros autores han sustituido parcialmente el uso de la IL2 con otras citocinas de la familia de la cadena gamma común, principalmente IL7, IL15 e IL21 (Hinrichs et al., 2008; Blood, 111(11) 5326-5333; Mueller et al., 2008, Eur. J. Immunol., 38(10) 2874-85; Zeng et al., 2005, J. Exp. Med., 201(1) 139-48; Markley and Sadelain, 2010, Blood, 115(17) 3508-3519; Zhang et al., 2015, Clin. Cancer Res., 21(10): 2278-88). Por tanto, el uso de IL2 se mantiene como una estrategia estándar en la activación y expansión de células T en inmunoterapias ACT.

La complejidad de la interacción de la IL2/IL2R y sus implicaciones en la diferenciación de las células T, continúa sin ser completamente comprendida. Particularmente, el impacto de la señalización preferencial a través de diferentes IL2R (IL2R $\alpha\beta\gamma$ o IL2R $\beta\gamma$) en la expansión/diferenciación *in vitro* de los linfocitos T todavía se desconoce. Ninguna de las mutantes de IL2 anteriormente descritas han sido ensayadas para expandir/diferenciar células T *in vitro* para terapias de ACT, ni tampoco se han reportado estrategias que direccionalicen preferencialmente la señal de IL2 a través del receptor de IL2 de afinidad intermedia (IL2R $\beta\gamma$).

Los autores de la presente invención encontraron ventajas sustanciales al emplear diferentes estrategias que preferentemente que dirijan la señal a través del IL2R $\beta\gamma$ durante la activación/expansión *in vitro* de los linfocitos T. Dichas estrategias inducen una eficiente expansión de las células T tumor-específicas con un marcado fenotipo de memoria central y una mayor capacidad anti-tumoral en comparación a las estrategias de cultivo tradicionales, las cuales emplean la IL2 nativa en algún punto. La presente invención permite una mejora sustancial a los protocolos actuales de expansión/diferenciación de células *in vitro*, antes de ser usadas en terapias de ACT en pacientes con cáncer.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* para el enriquecimiento y la expansión de linfocitos con un fenotipo de memoria central que comprende la expansión de linfocitos en una muestra obtenida de un sujeto o linfocitos aislados de dicha muestra, en donde la expansión comprende la activación del receptor de IL2 dimérico $\beta\gamma$.

35 Además, la presente invención proporciona un método *in vitro* para el enriquecimiento y expansión de linfocitos con un fenotipo de memoria central que comprende expandir linfocitos

en una muestra obtenida de un sujeto o linfocitos aislados de dicha muestra, en donde la expansión comprende la activación del receptor de IL2 dimérico β/γ .

La presente invención proporciona un método para el enriquecimiento y expansión de linfocitos con un fenotipo de memoria central para uso en terapias de transferencia adoptiva

5 de células, en donde la expansión comprende la activación del receptor de IL2 dimérico β/γ .

La presente invención se relaciona con un método para la diferenciación y/o expansión al fenotipo de memoria de linfocitos T y células NK utilizadas en terapias de transferencia adoptiva de células que comprende tres etapas. Dichas etapas son:

- i) Extracción de los linfocitos T y células NK de un sujeto,
- 10 ii) expansión y diferenciación *in vitro* de los linfocitos T y/o células NK con una estrategia que garantice una señalización preferencial a través del receptor de IL2 de afinidad intermedia (IL2R $\beta\gamma$), opcionalmente dichos linfocitos T y las células NK se pueden ingenierizar y
- iii) transferencia de las células activadas a un sujeto.

15 Particularmente, este método para la activación de los linfocitos T y células NK emplea una estrategia de señalización preferencial a través del IL2R $\beta\gamma$ que se selecciona del grupo que comprende:

- el cultivo de los linfocitos T y células NK con una muteína de IL2 soluble que tenga la propiedad de señalizar preferencialmente por el IL2R $\beta\gamma$,
- 20 - modificación genética de los linfocitos T y células NK para que secreten una muteína de IL2 que tenga la propiedad de señalizar preferencialmente por el IL2R $\beta\gamma$,
- el cultivo de los linfocitos T y células NK en presencia de IL2 nativa y un agente farmacológico que bloquee la interacción IL2-IL2R α (CD25),
- 25 - el cultivo de los linfocitos T y células NK en presencia de IL2 nativa y la modificación genética de los linfocitos T y células NK para que secreten una proteína soluble que bloquee la interacción IL2-IL2R α (CD25),
- el cultivo de los linfocitos T y células NK en presencia de IL2 nativa y la modificación genética de los linfocitos T y células NK para disminuir la expresión de IL2R α (CD25) en la superficie celular y
- 30 - el cultivo de los linfocitos T y células NK en presencia de IL2 nativa y la modificación genética de los linfocitos T y células NK para incrementar de la expresión del IL2R $\beta\gamma$.

35 Más particularmente las muteínas de IL2 comprenden las descritas en las SEQ ID NO.1 a 7 de la presente invención. Los agentes farmacológicos que bloquean la interacción de la IL2 con la cadena α de su receptor se seleccionan entre: un Ac o un fragmento de Ac que se une

a la IL2 o a la cadena α del receptor de IL2, un péptido o una molécula pequeña químicamente definida que se une a la IL2 o a la cadena α del receptor de IL2 y una forma soluble de la cadena α del receptor de IL2 o una variante modificada de esta.

En otra realización, en la segunda etapa del método la señalización a través del IL2R $\beta\gamma$ puede
5 ocurrir en diferentes momentos del cultivo de las células o mantenerse *in vitro* o *in vivo*. En la tercera etapa la transferencia de células se puede realizar al sujeto donador de las mismas o a uno diferente.

En algunas realizaciones, la expansión de los linfocitos con un fenotipo de memoria central comprende el uso de hormonas adicionales, citoquinas y condiciones de cultivo optimizadas
10 para la expansión de los linfocitos. Preferentemente las citocinas IL12, IL17, IL15 and IL21.

En particular, el método de la presente invención permite prolongar la persistencia de las células transferidas, así como un mayor efecto anti-tumoral *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*.

En ciertas realizaciones, la muestra se obtiene del drenaje de los ganglios linfáticos. En otras realizaciones, la muestra es un fragmento de tumor no tratado, un fragmento de tumor tratado
15 enzimáticamente, células tumorales disociadas/suspendidas, una muestra de ganglio linfático o una muestra de fluido corporal (por ejemplo, sangre, ascitis o linfa). En ciertas realizaciones, el sujeto es humano.

En otro aspecto, en la presente invención se describen métodos para tratar un tumor en un sujeto que lo necesite que comprenden la administración al sujeto de una cantidad efectiva
20 de linfocitos obtenidos con los métodos aquí descritos. En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor sólido. En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor líquido.

Es objeto de la presente invención el uso del método descrito para la terapia de transferencia adoptiva de células, particularmente en la obtención de linfocitos TILs o de receptores quiméricos de células T y más particularmente en el tratamiento del cáncer.

25 Son objeto de la presente invención las células obtenidas según el método descrito.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención brinda un método *ex vivo* para el enriquecimiento y expansión de linfocitos T y células NK con un fenotipo de memoria central que comprende expandir dichas poblaciones en una muestra obtenida de un sujeto o linfocitos y células NK aislados de dicha
30 muestra, donde la expansión comprende la activación del receptor de afinidad intermedia (IL2R $\beta\gamma$).

La presente invención brinda un método *in vivo* para el enriquecimiento y expansión de linfocitos T y células NK con un fenotipo de memoria central que comprende expandir dichas poblaciones en una muestra obtenida de un sujeto o linfocitos y células NK aislados de dicha
35 muestra, donde la expansión comprende la activación del IL2R $\beta\gamma$.

La presente invención brinda un método para el enriquecimiento y expansión de linfocitos T y células NK con un fenotipo de memoria central para el uso en terapias de ACT, donde la expansión comprende la activación del IL2R $\beta\gamma$.

La presente invención se basa en alterar la señalización a través del receptor de IL2 en los linfocitos T y células NK *in vitro* y *ex vivo*, para su uso en terapias de ACT. Esta invención propone primeramente sustituir la IL2 (y su señal nativa derivada) empleada en los protocolos de activación y cultivo *in vitro* de linfocitos T y células NK, antes de su transferencia *in vivo*, con estrategias que inducen una señalización preferencial a través del IL2R $\beta\gamma$. Tales estrategias incluyen, pero no se limitan a:

- 10 - el cultivo de los linfocitos T y células NK con una muteína de IL2 soluble que tenga la propiedad de señalizar preferencialmente por el IL2R $\beta\gamma$,
- modificación genética de los linfocitos T y células NK para que secreten una muteína de IL2 que tenga la propiedad de señalizar preferencialmente por el IL2R $\beta\gamma$,
- 15 - el cultivo de los linfocitos T y células NK en presencia de IL2 nativa y un agente farmacológico que bloquee la interacción IL2-IL2R α (CD25),
- el cultivo de los linfocitos T y células NK en presencia de IL2 nativa y la modificación genética de los linfocitos T y células NK para que secreten una proteína soluble que bloquee la interacción IL2-IL2R α (CD25),
- 20 - el cultivo de los linfocitos T y células NK en presencia de IL2 nativa y la modificación genética de los linfocitos T y células NK para disminuir la expresión de IL2R α (CD25) en la superficie celular y
- el cultivo de los linfocitos T y células NK en presencia de IL2 nativa y la modificación genética de los linfocitos T y células NK para incrementar de la
- 25 expresión del IL2R $\beta\gamma$.

El método aquí descrito brinda estrategias para expandir/diferenciar células T y NK activadas con un fenotipo de memoria central, altamente efectivas en el control del tumor cuando se transfieren *in vivo*. Esta invención representa una mejora sustancial en las actuales terapias de ACT.

- 30 El cultivo de las células de acuerdo al método de la presente invención puede realizarse usando medios de cultivo apropiados y bajo condiciones ambientales adecuadas para el cultivo *in vitro* de células del sistema inmune. La expansión de las células se puede realizar en presencia de otras citocinas como la IL12, IL17, IL15 e IL21. La expansión de las células puede realizarse utilizando cualquiera de los protocolos reportados para ACT. En la fase del
- 35 cultivo donde se emplea la IL2 en estos protocolos, se sustituye la señal de la IL2 nativa por cualquiera de las estrategias descritas en detalle en la presente solicitud. Adicionalmente, las células pueden ser o no ingenierizadas para expresar: un CAR; un TCR con una especificidad

deseada; otros receptores de interés en la membrana celular; secretar diferentes citocinas o proteínas solubles de interés.

El método descrito en la presente invención cuando se refiere a las células en que se aplica se refiere a cualquiera de las siguientes: una mezcla de células T, células T purificadas tanto

5 CD8+ como CD4+, células NK, células NKT. Dichas células se pueden obtener de células mononucleares de sangre periférica, de nódulos linfoides de drenaje del tumor o de infiltrados tumorales.

Los términos “muteína de IL2”, “muteína no- α ”, “muteína IL2 no- α ”, “agonista parcial de IL2” o mutante de IL2 son usados aquí intercambiablemente y se refieren a una proteína de IL2

10 mutada, donde las mutaciones inducen la activación del IL2R $\beta\gamma$, preferencialmente interactúan con el receptor dimérico de IL2 (IL2R $\beta\gamma$), inducen, tienen una reducida afinidad por el IL2R α , o tienen una mayor afinidad por el receptor IL2R $\beta\gamma$. Ejemplos no limitantes de estas muteínas de IL2 están en la SEQ ID NO. 1-7.

Los términos “linfocitos” y “célula linfoide” son usados aquí intercambiablemente y se refieren

15 a cualquier célula que media la inmunidad en un sujeto incluyendo linfocitos, linfoblastos y células plasmáticas. En algunas realizaciones de la presente invención, estos términos se refieren a una clase de células blancas sanguíneas que portan receptores de superficie con especificada por un antígeno determinado y son responsables de la respuesta inmune adaptativa. Dichas células pueden mediar la inmunidad humoral y celular. En otras

20 realizaciones de la presente invención, estos términos se refieren a una clase de linfocitos que no portan receptores de superficie con especificada por un antígeno determinado y participan en la respuesta inmune innata.

Las estrategias que aquí se proponen pueden ser empleadas con fines terapéuticos para el tratamiento del cáncer en terapias de ACT en un sujeto que puede ser humano o animal.

25 En otro aspecto, en la presente invención se describen métodos para tratar un tumor en un sujeto que lo necesite que comprenden la administración al sujeto de una cantidad efectiva de linfocitos obtenidos con los métodos aquí descritos. En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor sólido (por ejemplo: tumor de ovario, melanoma, tumor de pulmón, tumor gastrointestinal, tumor de mama). En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor líquido (por

30 ejemplo: leucemia o linfoma). En ciertas realizaciones, el tumor expresa una mutación consistente en al menos un péptido que comprende un antígeno tumoral. En ciertas realizaciones, el sujeto es humano.

Uso de citocinas ingenierizadas derivadas de la IL2 que preferencialmente señalizan por el IL2R $\beta\gamma$

35

Una realización de la presente invención se refiere, en particular, al empleo de variantes mutadas de la IL2 que señalizan preferencialmente a través del IL2R $\beta\gamma$, durante los protocolos

de activación y expansión de células T. Las variantes mutadas de IL2 incluyen, aunque no se limitan a: variantes con afinidad reducida por IL2R α , por ejemplo, las variantes descritas en US 9,206,243 que se corresponden con las secuencias SEQ ID NO. 1-6 de la presente invención; así como la muteína F42 descrita Heaton y colaboradores en 1994 y que
5 corresponde a la SEQ ID NO.7 de la presente invención (Heaton y cols. Cancer Res. (1994) 53: 2597–2602).

En el cultivo de los linfocitos T, además de las variantes mutadas de IL2, se emplea estimulación por el TCR con perlas magnéticas recubiertas con antiCD3/antiCD28 o con antígenos específicos. Estas variantes mutadas de IL2 pueden mantenerse durante todo el
10 cultivo o pueden usarse en fases específicas del cultivo, preferencialmente en los primeros momentos de activación. Las variantes mutadas de IL2 se pueden emplear en un rango de concentraciones desde 1 ng/ml hasta 1 mg/ml, preferiblemente desde 1 μ g hasta 5 μ g.

La expansión de las células pudiera seguir cualquiera de los protocolos reportados en el contexto de ACT. En la fase de cultivo, donde se utiliza la IL2 nativa en los protocolos
15 tradicionales, se añade en su lugar una muteína de IL2. Por ejemplo, pudiera ser un protocolo basado en el cultivo de células con Acs antiCD3/CD28 y la muteína de IL2 o pudiera combinarse la muteína de IL2 con otra citocinas como IL7, IL15, IL12 o IL21.

Ingenierizar las células para secretar muteínas de IL2 que preferencialmente señalizan por el IL2R $\beta\gamma$

20 De acuerdo al método descrito en la presente invención se pueden modificar genéticamente las células para secretar cualquiera de las muteínas de IL2 referidas en esta invención. Dicha modificación de las células pudiera realizarse con cualquiera de los métodos bien descritos relacionadas a transducción o transfección y ampliamente utilizados en el contexto de la tecnología ACT.

25 Por ejemplo, se puede llevar a cabo usando técnicas de edición del genoma o vectores virales para introducir un constructo en las células con el gen de la muteína. El constructo pudiera contener un gen reportero para seguir fácilmente la eficiencia de la transducción o un gen de resistencia a antibióticos para enriquecer la población de células exitosamente transducidas. La eficiencia de la transducción/transfección debe ser alta, al menos lo suficientemente alta
30 para garantizar una señal autocrina de IL2 preferencialmente a través del IL2R $\beta\gamma$ durante la expansión *in vitro*. Este procedimiento particular le concede a las células disponibilidad para una señal constante por el receptor de IL2 de afinidad intermedia después de la transferencia *in vivo*, contribuyendo a la persistencia de las células y a su capacidad anti-tumoral.

35

La expansión de las células ingenierizadas pudiera seguir cualquiera de los protocolos en el contexto de ACT pero sin adición de IL2 nativa al cultivo. Por ejemplo, las células pudieran ser activadas con una señalización específica por el TCR, con una activación por CD3/CD28 sola y/o en combinación con citocinas de supervivencia como IL7, IL15 e IL21.

5 **Adición de agentes farmacológicos que afecten la interacción entre la IL2/IL2R α en los cultivos de células linfoides.**

Otra estrategia que emplea el método de la presente invención consiste en bloquear la interacción IL2/IL2R α cuando se emplea la IL2 nativa en la expansión de células para ACT empleando un agente farmacológico. La adición de tal agente desvía la señal de la IL2 nativa
10 hacia el IL2R $\beta\gamma$ preferencialmente, al bloquear el acceso de la IL2 al receptor IL2R α (CD25). El protocolo de activación/expansión pudiera combinar señalización específica por el TCR, activación por CD3/CD28 y otras citocinas de interés. El agente farmacológico y la IL2 deben utilizarse siempre juntos y añadirse en el cultivo al mismo tiempo. La señal parcial de IL2 a través del IL2R $\beta\gamma$ resultante puede mantenerse durante todo el cultivo o en etapas fases
15 específicas o preferencialmente durante la primera etapa de la activación. El agente farmacológico debe utilizarse en exceso para reforzar su capacidad de bloqueo, las cantidades específicas deben calibrarse caso a caso, chequeando la capacidad para bloquear la unión de la IL2 a CD25.

Los agentes farmacológicos utilizados para bloquear la interacción IL2-IL2R α , en la presente
20 invención incluyen, pero no se limitan a: Acs o fragmentos de Acs que se unan al IL2R α o a la IL2; péptidos o moléculas pequeñas químicamente definidas que se unan al IL2R α o a la IL2 o una forma soluble del IL2R α o una variante modificada del mismo.

En el caso de los agentes farmacológicos que se unen a la IL2 debe verificarse su capacidad para bloquear la interacción con el IL2R α , sin afectar la unión y señalización a través del
25 IL2R $\beta\gamma$. Estos agentes puede añadirse separados de la IL2 en el cultivo, pero pudieran mezclarse con la IL2 previamente para facilitar la formación del complejo deseado.

La expansión de las células pudiera seguir cualquiera de los protocolos reportados en el contexto de ACT pero en la fase de cultivo, donde se utiliza la IL2 en los protocolos originales se añade también el agente farmacológico. Por ejemplo, pudiera ser un protocolo basado
30 solamente en el cultivo de las células con Ac antiCD3/CD28 y la IL2 más el agente bloqueador o, pudiera combinarse la IL2 más el agente bloqueador con otras citocinas como IL7, IL15, IL12 e IL21.

Ingenierización genética de las células para secretar proteínas solubles que bloqueen la interacción IL2/IL2R α

Otra estrategia de la presente invención se relaciona con modificar genéticamente las células para secretar una proteína soluble, la cual bloquee específicamente la interacción IL2/IL2R α .

- 5 La modificación de las células pudiera realizarse con cualquiera de los métodos de transducción o transfección bien descritos y que son ampliamente usados en el contexto de ACT. Por ejemplo, se puede llevar a cabo usando técnicas de edición del genoma o vectores virales para introducir un constructo en las células con el gen de la proteína deseada. La eficiencia de la transducción/transfección debe ser alta, al menos lo suficientemente alta para
- 10 que las células produzcan suficiente proteína soluble para que se produzca un bloqueo significativo de la interacción IL2/IL2R α y la señal se dirija preferencialmente a través del IL2R $\beta\gamma$, durante la expansión *in vitro*.

Las proteínas que pudieran usarse para el bloqueo de la interacción IL2/IL2R α según la presente invención, incluyen pero no se limitan a: un Ac o fragmento de este que se une al

15 IL2R α o a la IL2; una forma soluble del IL2R α o alguna variante modificada del mismo.

La expansión de las células pudiera seguir cualquiera de los protocolos reportados en el contexto de ACT; sin ninguna variación en esta estrategia solo las estrictamente necesarias para la ingenierización de las células. Por ejemplo, el cultivo de las células con Acs antiCD3/CD28 y la IL2 o pudiera combinarse la IL2 con otras citocinas como IL7, IL15, IL12

20 e IL21.

Ingenierización de linfocitos T para disminuir la expresión del IL2R α en la membrana celular

Otra estrategia de la presente invención se refiere a la modificación genética de las células para reducir la expresión del IL2R α en la superficie celular. Para la ingenierización varias

25 estrategias se pudieran utilizar que incluyen, pero no se limitan a: RNA de interferencia, técnicas de edición del genoma y estrategias para el *knockout* de genes específicos.

La modificación de las células pudiera realizarse con cualquiera de los métodos bien descritos relacionadas a transducción o transfección y ampliamente utilizados en el contexto de la tecnología ACT. Por ejemplo, la reducción o la supresión total de la expresión del CD25 en

30 las células se pudiera llevar a cabo utilizando vectores virales para introducir en las células la construcción genética que contiene una pequeña horquilla de RNA específica para bloquear la expresión de IL2R α .

La expansión de las células pudiera seguir cualquiera de los protocolos reportados en el contexto de ACT; sin ninguna variación en esta estrategia solo las estrictamente necesarias

35 para la ingenierización de las células. Por ejemplo, el cultivo de las células con Acs

antiCD3/CD28 y la IL2 o pudiera combinarse la IL2 con otras citocinas como IL7, IL15, IL12 e IL21.

Ingenierización de linfocitos T para incrementar la expresión del IL2R $\beta\gamma$ en la membrana celular

- 5 Otra estrategia de la presente invención se refiere a la modificación genética de las células para incrementar la expresión del IL2R $\beta\gamma$ en la superficie celular. Esta estrategia se puede realizar utilizando vectores virales para introducir en las células un constructo con el gen que codifica para el CD122 (cadena beta del IL2R) o un constructo con el gen que codifica para CD132 (cadena gamma del IL2R) bajo promotores de expresión constitutiva.
- 10 Alternativamente, en esta estrategia las células se pueden modificar genéticamente para sustituir la expresión del CD122 nativo por una variante mutada del mismo con afinidad incrementada por la IL2 en lugar de emplear el CD122 nativo. Esto se puede lograr empleando técnicas de edición del genoma o con auxilio de vectores virales para introducir en las células la construcción genética con el gen del CD122 mutado.
- 15 En las estrategias que se describen, las construcciones genéticas pueden contener además de los genes de interés, genes reporteros para evaluar de forma fácil y rápida la eficiencia de la transducción, así como genes que confieren resistencia a antibióticos específicos para enriquecer la población de células exitosamente transducidas.
- La expansión de las células pudiera seguir cualquiera de los protocolos reportados en el contexto de ACT; sin ninguna variación en esta estrategia solo las estrictamente necesarias para la ingenierización de las células. Por ejemplo, el cultivo de las células con Acs antiCD3/CD28 y la IL2 o pudiera combinarse la IL2 con otras citocinas como IL7, IL15, IL12 e IL21.
- 20

Métodos de tratamiento

- 25 En un aspecto relacionado, en la presente invención se describe un método para tratar un tumor en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una población de linfocitos producida por los métodos aquí descritos. En ciertas realizaciones, los tumores son tumores sólidos. En ciertas realizaciones, los tumores son tumores líquidos (por ejemplo, cánceres de sangre).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Comparación del fenotipo de células T obtenido cuando se cultivan con IL2 nativa o con la muteína de IL2 que señala preferencialmente a través del receptor de afinidad intermedia IL2R $\beta\gamma$. A) viabilidad celular, B) Porcentaje de células efectoras y de memoria.

- Figura 2.** Comparación del fenotipo T obtenido cuando las células se cultivan en un amplio rango de concentraciones de IL2 nativa y de la muteína de IL2 que señala preferencialmente
- 35

a través del IL2R $\beta\gamma$ en relación a: A) viabilidad celular, B) porcentaje de células PD1 positivas y C). porcentaje de células con fenotipo de memoria central.

Figura 3. Comparación del fenotipo de células T recuperado cuando estas se cultivan con la IL2 nativa y una muteína de IL2 que señala preferencialmente por el IL2R $\beta\gamma$ sobre las células T combinadas con IL-7 e IL-15 en relación a: A), viabilidad celular, B) porcentaje de células efectoras y de memoria.

Figura 4. Comparación del fenotipo recuperado en las células T cuando se cultivan con IL2 nativa o con la muteína de IL2 que señala preferencialmente a través del receptor de afinidad intermedia, en un amplio rango de dosis, combinadas con IL7 e IL15. A) viabilidad celular y B) porcentaje de células PD1 positivas y C) porcentaje de células con fenotipo de memoria central.

Figura 5. Comparación del fenotipo celular obtenido cuando las células se estimulan con la IL2 o la muteína de IL2 solamente o con IL2 o la muteína de IL2 combinada con IL7 e IL15.

Figura 6A. Histograma que muestra el porcentaje de células eGFP positivas, lo cual indica la eficiencia de la transducción para la IL2 o la muteína de IL2.

Figura 6B. Comparación en cuanto al porcentaje de células de memoria y efectoras recuperadas en cultivo cuando los linfocitos se transducen para producir la IL2 nativa o la muteína de IL2.

Figura 7A. Histograma que muestra la eficiencia en la disminución de la expresión del CD25 en los linfocitos al emplear diferentes shRNA.

Figura 7B. Comparación en cuanto al porcentaje de células de memoria y efectoras a medida que se logra una mayor disminución de la expresión del CD25 en los linfocitos.

Figura 8. Comparación del efecto de direccionar la señalización de la IL2 nativa hacia el IL2R $\beta\gamma$ al emplear un Ac anti-CD25 sobre las células T CD8⁺ en relación a: A) viabilidad celular y B) porcentaje de células de efectoras y de memoria.

Figura 9. Capacidad funcional de las células T CD8⁺ con IL2 sola, IL2+IL15+IL7, la muteína de IL2 sola o la muteína de IL2+IL15+IL7. A) producción de Granzima β por las células T OT1 CD8⁺ re-estimuladas con el péptido SIINFEKL, B) Capacidad citotóxica contra las células B16OVA por las células OT1 cultivadas con IL2, la muteína de IL2 sola o en combinación con IL7 e IL15.

Figura 10. Medición del volumen tumoral en animales portadores del tumor MB16OVA que recibieron como tratamiento células OT1 cultivadas con IL2 nativa o con la muteína de IL2.

Figura 11. Comparación del efecto anti-tumoral *in vivo* de las células T OT1 transducidas para producir IL2 nativa o la muteína de IL2 que señala preferencialmente a través del IL2R $\beta\gamma$. A) volumen tumoral, B) supervivencia en el tiempo.

Figura 12. Caracterización de TILs CD8⁺ antes y después del cultivo con IL2 o con la muteína de IL2 en cuanto a: A) Nivel de expansión, B) Porcentaje de expresión de Ki-67 por los TILs

y C) distribución de células T vírgenes (CD62L+CD44-), de memoria central (CD62L+CD44+), efectoras de memoria (CD62L-CD44+).

Figura 13. Caracterización de TILs CD8+ antes y después del cultivo con IL2 o con la muteína de IL2 en cuanto a: A) porcentaje de expresión de marcadores inhibitorios, B) producción de INF γ , TNF α Granzyma β .

Figura 14. Expansión de células NK en los TILs cultivados con IL2 o con la muteína de IL2. A) porcentaje de células NK, B) número de células NK.

Ejemplos

Ejemplo 1. La sustitución de la IL2 nativa por una muteína de IL2 que señala preferencialmente por el IL2R $\beta\gamma$ preserva la viabilidad de los linfocitos y confiere un fenotipo de memoria central.

Se aislaron las células T CD8+ vírgenes a partir del bazo de ratones de la línea OT1. Para la estimulación del TCR se emplearon perlas magnéticas recubiertas con Acs antiCD3/antiCD28 durante siete días, adicionalmente se mantuvo la estimulación con la IL2 nativa o la muteína de IL2 obtenida en el Centro de Inmunología Molecular lote No. 1201602 y que se divulga en la SEQ ID NO.6 de la patente US 9,206,243 durante diez días. Cada dos días el cultivo se expandió para mantener la densidad celular en 1×10^6 y se añadieron las citocinas con medio fresco. Se alcanzó una exitosa expansión de un gran número de células T en ambas condiciones de cultivo y se observaron similares niveles de proliferación. En la Figura 1A se observa que al emplear la muteína de IL2 para estimular las células OT1 se mejoró significativamente la viabilidad celular ($p < 0.0001$), medida por citometría de flujo, en comparación con las células estimuladas con IL2 nativa. Adicionalmente se midió por citometría de flujo la cantidad de células de memoria y la expresión de marcadores de activación e inhibición. Las células estimuladas con la muteína en comparación con las estimuladas con IL2 nativa, mostraron un porcentaje significativamente mayor en el fenotipo de memoria central ($p < 0.0001$), definidas por los marcadores CD62L+/CD44+ (Figura 1B). El análisis fenotípico de los marcadores PD-1, Klrp1, Lag-3 y Tim-3 mostró que las células activadas con la muteínas de IL2 reprimen la expresión de ligandos de puntos de control del sistema inmune (PD-1, Klrp1, Lag-3 y Tim-3) (Tabla 1).

Tabla 1. Expresión de diferentes marcadores de agotamiento (% de células positivas) frente a las dos variantes de estimulación utilizadas.

Marcador	IL2 nativa	muteína de IL2
PD1	2.61	0.38
TIM3	17.0	0.42

Lag3	79.9	15.9
Klrg1	12.4	0.06

Los efectos antes descritos se mantienen en un rango de dosis tanto para las células estimuladas con la muteína de IL2 como para la IL2 nativa en cuanto a viabilidad (Figura 2A), expresión de PD1 (Figura 2B) y expresión de CD62L (Figura 2C).

- 5 Estos resultados en su conjunto indican que la sustitución de la IL2 nativa por una muteína de IL2 con una estimulación preferencial por el IL2R $\beta\gamma$, promueve una diferenciación hacia un fenotipo de memoria central en lugar de hacia el fenotipo efector que induce la IL2 nativa. La muteína de IL2 confiere un mayor potencial para la recirculación linfocitaria (mayor expresión de CD62L) y una mayor resistencia al agotamiento (menor expresión de PD1), que
- 10 es el fenotipo más deseado para la transferencia *in vivo* de células T.

Ejemplo 2. La sustitución de la IL2 nativa por una muteína de IL2 que señala preferencialmente por el IL2R $\beta\gamma$ favorece el fenotipo de memoria central en protocolos de cultivo en combinación con IL7 e IL15.

- Como está descrito por otros autores, la combinación de la IL7 e IL15 con la IL2 mejora el
- 15 desempeño de las células T en comparación con la IL2 solamente (Redeker and Arens, 2016, Front Immunol. 6(7): 345). En nuestro experimento, la IL2 o la muteína de IL2 se combinaron en cultivo con IL7 e IL15 para la activación/expansión de las células OT1.

- En esta estrategia, para la estimulación del TCR se empleó el mismo procedimiento del
- 20 Ejemplo 1. La IL2 o la muteína de IL2 se añadieron al comienzo del cultivo hasta el quinto día, posteriormente las células se mantuvieron con IL-7/IL-15 por diez días. En este escenario, ambas condiciones de cultivo brindaron una similar densidad celular en cultivo, una alta viabilidad (Figura 3A) y favorecieron la prevalencia de células de memoria en lugar de efectoras. Sin embargo, las células que se cultivaron con la muteína mostraron una mayor proporción de células de memoria central en el cultivo en comparación a las cultivadas con la
- 25 IL2 nativa ($p < 0.0015$) como se muestra en la Figura 3B.

A su vez, las células cultivadas con la muteína mostraron una menor expresión de marcadores de agotamiento como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Expresión de diferentes marcadores de agotamiento (% de células positivas) cuando la IL2 nativa o la muteína de IL2 es utilizada para la activación/expansión *in vitro*, combinadas con IL7 e IL15.

Marcador	IL2 nativa	muteína de IL2
PD1	1.69	0.48
TIM3	10.3	0.18
Lag3	84.3	21.1
Klrg1	6.07	0.05

5

Como parte del protocolo de combinación con IL7 e IL15 se evaluaron diferentes concentraciones de la IL2 nativa y la muteína de IL2 y se demostró que el efecto descrito es similar en un determinado rango de dosis en cuanto a: viabilidad celular (Figure 4A), expresión de PD1 (Figure 4B) y prevalencia de células de memoria (Figure 4C).

10 Aunque la combinación de IL2 nativa con IL7 e IL15 mejora las condiciones de cultivo cuando se compara con la IL2 nativa solamente, no se observa una mejora cuando se utiliza la muteína de IL2 en protocolos combinados debido a que la muteína sola es altamente efectiva en preservar la viabilidad celular e inducir un fenotipo de memoria central. Adicionalmente, la muteína de IL2 sola es tan efectiva como la combinación de IL2, IL7 e IL15 en inducir un
15 fenotipo de memoria central en las células T activadas. (Figura 5).

Ejemplo 3. Las células T ingenierizadas para producir la muteína que señala preferencialmente por el IL2R β adquieren un fenotipo de memoria central.

Con el propósito de obtener una fuente de suministro continuo de citocina tanto *in vitro* como *in vivo*, se modificaron genéticamente las células T para que produjeran la muteína de IL2
20 citada en el Ejemplo 1. Se utilizaron constructos de retrovirus que codifica para la proteína verde fluorescente (del inglés eGFP) y la IL2 nativa o la muteína de IL2. El procedimiento de transducción se inició con la estimulación de células T vírgenes de ratones OT1 recién aisladas con perlas magnéticas recubiertas con Acs antiCD3/antiCD28 y con IL2 nativa o con la muteína de IL2. El sobrenadante del vector retroviral concentrado se añadió a las células
25 en placas recubiertas con retronectina a las 24 y 48h. Después de la transducción, la estimulación del TCR es mantenida por 7 días con perlas magnéticas recubiertas de Acs antiCD3/antiCD28 junto con la IL-7/IL-15 durante 10 días. La eficiencia de transducción se confirmó mediante la medición de eGFP y se comprobó que era mayor de 80% tanto con la IL2 nativa como con la muteína (Figura 6A). Después de la transducción, en el sobrenadante
30 del cultivo se cuantificaron por ELISA las moléculas IL2 nativa o la muteína de IL2 secretadas.

De manera similar a lo observado cuando las células T OT1 se cultivaron con la muteína de IL2 soluble, las células ingenierizadas con la misma tuvieron el fenotipo de memoria central en comparación con las células ingenierizadas con la IL2 nativa que resultaron ser del tipo efector mayoritariamente ($p < 0.0001$) (Figura 6B) y mostraron una menor expresión de marcadores de agotamiento (Tabla 3).

Tabla 3. Expresión de marcadores de agotamiento (% de células positivas) después de ingenierizadas con la IL-nativa o la muteína de IL2.

Marcador	IL2 nativa	muteína de IL2
PD1	3.02	0.67
TIM3	17.0	0.35
Lag3	80.1	36.2

Todos estos resultados muestran que favorecer la señalización por el IL2R $\beta\gamma$ favorece la diferenciación a células de memoria central a pesar de tener una señalización constante y sostenida.

Ejemplo 4. La ingenierización genética para disminuir la expresión del CD25 en los linfocitos, favorece el fenotipo de memoria central en las células T activadas con la IL2 nativa.

Se emplearon los vectores que codifican para eGFP y para una pequeña horquilla de RNA (shRNA) dirigida a bloquear la expresión del gen de la cadena α de la IL2 (CD25). El procedimiento de transducción se inició con la estimulación de células T vírgenes de ratones OT1 recién aisladas con perlas magnéticas recubiertas con Acs antiCD3/antiCD28 y con IL2 nativa. Se utilizaron tres construcciones diferentes de shRNA y se obtuvieron eficiencias diferentes de *knockdown* basado en la expresión de CD25 en superficie. Como control de transducción se usó una construcción que codifica para eGFP y para una shRNA que no afecta la expresión del gen de la cadena α de la IL2. Después de dos rondas de transducción, las células se mantuvieron en cultivo por cinco días con IL2 (50 UI/ml). La reducción en la expresión del CD25 se midió por citometría de flujo (Figura 7A). El porcentaje de células de memoria central después de la estimulación con IL2 es superior cuando se logra una mayor disminución en la expresión del CD25 (Figura 7B).

Con la disminución de la expresión del CD25 se brinda un escenario para la estimulación a través del IL2R $\beta\gamma$ con la IL2 y en estas condiciones se favorece la diferenciación a células T CD8⁺ de memoria central.

Ejemplo 5. El fenotipo de memoria central se obtiene al estimular las células con IL2 y bloquear simultáneamente la interacción con CD25 a través de agentes farmacológicos añadidos al cultivo.

- En otro ensayo para direccionalizar la señalización a través del IL2R $\beta\gamma$ se utilizó un Ac contra el CD25 junto a la IL2 nativa para la activación *in vitro* de las células T. Se cultivaron células T de ratones OT1 con perlas magnéticas recubiertas con Acs antiCD3/antiCD28 y con 50 UI/ml de IL2 y 10 μ g/ml de un Ac monoclonal anti-CD25 (BioLegend clone 3C7). El Ac anti-CD25 se añadió desde el día 0 y se fue renovando cuando se añadía medio fresco con IL2 nativa cada dos días hasta completar 10 días. Como control se utilizó un Ac con especificidad irrelevante del mismo isotipo del anti-CD25 empleado. Transcurrido este tiempo se observó que la adición del Ac anti-CD25 durante la activación con IL2 nativa incrementó la viabilidad celular y la población de células T de memoria central en comparación con el control de isotipo ($p < 0,0001$) (Figuras 8A y 8B respectivamente). Además, se observó que al añadir el Ac anti-CD25 al cultivo, las células tienen menor expresión de marcadores de agotamiento (Tabla 4).
- Tabla 4.** Expresión de marcadores de agotamiento de las células después de bloquear con un anti-CD25 junto a la IL-nativa o la muteína de IL2.

Marcador	Control de isotipo	Anti-CD25
PD1	4.12	3.33
TIM3	18.5	0.54
Lag3	80.2	21.3

- Estos resultados sugieren que al direccionalizar la señal a través del IL2R $\beta\gamma$ por el bloqueo de la interacción con CD25, las células son dirigidas hacia un fenotipo de memoria central, que es el adecuado para terapias de transferencia adoptiva de células.

Ejemplo 6. Las células T que reciben una activación preferencial a través del IL2R $\beta\gamma$, muestran una eficiente citotoxicidad antígeno específica de las células T *in vitro*.

- Se realizó un ensayo de citotoxicidad con el propósito de verificar la capacidad funcional de las células T de memoria central, activadas a través del IL2R $\beta\gamma$. Se emplearon células T de ratones OT1 activadas con la metodología descrita en los Ejemplos 1 y 3. Estas células se estimularon con su antígeno específico (el péptido SIINFEKL) y se determinó por citometría de flujo la capacidad de producir Granzyma β . Con el objetivo de evaluar la capacidad citotóxica, las células OT1 activadas con la metodología descrita en los Ejemplos 1 y 3, se co-cultivaron con células de melanoma B16 transducidas para expresar el antígeno nominal OVA en su superficie (B16-OVA) en una proporción de 1:1, como control se utilizaron células

de melanoma B16 sin transducir. Se añadió al cultivo el reactivo IncuCyteCytotox y se monitoreó la muerte celular cada dos horas por un total de 60 h. Se confirmó que la lisis de las células blanco fue antígeno-específica debido a que no se obtuvo lisis en las células controles.

- 5 Las células OT1 activadas con la muteína de IL2 que señala preferencialmente el IL2R $\beta\gamma$ mostró una actividad de lisis directa efectiva *ex vivo*, lo que demuestra que cuando la señalización se dirige a través del IL2R $\beta\gamma$ se diferencian a potentes células citotóxicas (Figura 9A y B).

10 **Ejemplo 7. Las células T que reciben una activación por el IL2R $\beta\gamma$ muestran mejor actividad antitumoral cuando se usa en modelos de transferencia adoptiva de células.**

El modelo de ratones OT1 junto a la línea tumoral B16/OVA representa una aproximación preclínica de la terapia adoptiva de células. Se emplearon como receptores ratones de la línea C57BL/6 que recibieron una inyección subcutánea de 1×10^5 células de melanoma que expresan el péptido OVA, transcurridos diez días se irradiaron con dosis sub-letales (5Gy).

- 15 Los animales se dividieron en cuatro grupos de tratamiento y los días 11 y 15 recibieron una transferencia intravenosa de 1×10^6 células T de ratones OT1 activadas de la siguiente forma:

Grupo 1: no recibió tratamiento (control)

Grupo 2: células T OT1 activadas con IL2 nativa (como se describió en el Ejemplo 1)

Grupo 3: células T OT1 activadas con la muteína de IL2 (como se describió en el Ejemplo 1)

- 20 Grupo 4: células T OT1 activadas con la muteína de IL2 combinada con IL7+IL15 (como se describió en el Ejemplo 2).

- Como se observa en la Figura 10, la terapia ACT empleando células que se activan con la muteína de IL2 controla mejor el crecimiento tumoral en comparación con las células activadas con la IL2 nativa. Estos resultados indican que el fenotipo de memoria inducido inicialmente con baja expresión de marcadores de agotamiento que se obtiene al activar las células con la muteína de IL2 fue una estrategia efectiva para controlar el tumor *in vivo*.
- 25

Ejemplo 8. Las células T ingenierizadas para la producción de la muteína de IL2 que señala preferencialmente por el IL2R $\beta\gamma$ mostraron una robusta actividad anti-tumoral cuando se usaron en transferencia adoptiva de células.

- 30 Con el objetivo de mejorar la efectividad del método ACT, se ingenierizaron genéticamente células T para producir la muteína de IL2. La inserción del gen permite una señal continua y sostenida de la muteína en las células T tanto *in vitro* como *in vivo*. Se emplearon como receptores ratones de la línea C57BL/6 que recibieron una inyección subcutánea de 1×10^5 células de melanoma que expresan el péptido OVA, transcurridos diez días se irradiaron con dosis sub-letales (5Gy). Los animales se dividieron en tres grupos de tratamiento y los días
- 35

11 y 15 recibieron una transferencia intravenosa de 1×10^6 células T de ratones OT1 de la siguiente forma:

Grupo 1: no recibió tratamiento (control).

Grupo 2: células T OT1 ingenierizadas para producir IL2 nativa (el protocolo de transducción fue el mismo que el empleado en el Ejemplo 3).

Grupo 3: células T OT1 ingenierizadas para producir la muteína de IL2 (el protocolo de transducción fue el mismo que el empleado en el Ejemplo 3).

La Figura 11 muestra que los animales que recibieron las células ingenierizadas para producir la muteína de IL2, experimentan un control del crecimiento del tumor establecido (Figura 11A) y una mayor supervivencia (Figura 11B).

Ejemplo 9. Generación de TILs utilizando la muteína de IL-2.

Debido a que las terapias de ACT pueden realizarse utilizando TILs, se evaluó el efecto de la muteína de IL2 en la expansión de estos linfocitos. Para estudiar el papel de la activación del receptor de IL2 dimérico β/γ en los TILs, se aislaron tumores MC38 a partir de ratones C57BL/6 entre los días 19-21 después de la inoculación de las células tumorales. Los tumores se disociaron mecánicamente y se cultivaron durante 14-16 días en presencia de IL2 nativa o de la muteína de IL2. Se encontró que la expansión de TILs fue mayor cuando la muteína de IL2 se usó en condiciones de cultivo. Consistentemente, la muteína de IL2 incrementó la tasa de proliferación de TILs (Figura 12A y B). Adicionalmente, los TILs cultivados *ex vivo* con la muteína de IL2 mostraron una expansión significativa de células T de memoria central en comparación con los controles (Figura 12C). De manera general, estos datos muestran que los TILs expandidos con la muteína de IL2 tuvieron una mayor proliferación manteniendo un fenotipo de memoria.

Ejemplo 10: Los TILs expandidos con la muteína de IL2 son polifuncionales y muestran una reducción de los marcadores de activación y agotamiento.

A los TILs obtenidos con la metodología utilizada en el Ejemplo 9 se les realizó una caracterización fenotípica y de sus propiedades funcionales antes de la expansión, estos se estimularon por 4 horas en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD2. Se encontró que los receptores inhibitorios PD-1, Lag-3 y Tim-3 estaban dramáticamente reducidos en los TILs expandidos con la muteína de IL2 (Figura 13A). En cuanto a su funcionalidad, se encontró que los que se expandieron con la muteína de IL2 mostraron una producción de INF γ , TNF α y Granzima β (Figura 13B). Colectivamente, estos resultados muestran la habilidad de la muteína de IL2 para expandir los TILs y enriquecerlos hacia un fenotipo de memoria central sin comprometer su funcionalidad.

35

Ejemplo 11. Generación de células NK en los TILs utilizando la muteína de IL2.

Para estudiar el papel de la activación del receptor de IL2 dimérico β/γ en la proporción de células NK entre el total de TILs expandidos, se aislaron tumores MC38 a partir de ratones C57BL/6 entre los días 19-21 después de la inoculación de las células tumorales. Los tumores se disociaron mecánicamente y se cultivaron durante 14-16 días en presencia de IL2 nativa o de la muteína de IL2. Los TILs cultivados *ex vivo* con la muteína de IL2 mostraron una expansión significativa de células NK en comparación con la IL2 nativa en términos de proporción del total (Figura 14A) y de números absolutos (Figura 14B).

10

15

20