

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la diferenciación y expansión de linfocitos T y células NK con fenotipo de memoria central utilizadas en terapias de transferencia adoptiva de células que comprende tres etapas:
  - i) Extracción de los linfocitos T y/o 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 2. El método según la reivindicación 1 donde la estrategia para inducir una señalización preferencial a través del IL2R $\beta\gamma$  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 $\beta\gamma$ ,
  - 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
  - 20 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 $\alpha$  (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
  - 25 proteína soluble que bloquee la interacción IL2-IL2R $\alpha$ ,
  - 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 $\alpha$  en la superficie celular y
  - el cultivo de los linfocitos T y células NK en presencia de IL2 nativa y la
  - 30 modificación genética de los linfocitos T y células NK para incrementar de la expresión del IL2R $\beta\gamma$ .
3. El método según la reivindicación 2 donde la muteína de IL2 se selecciona del grupo que comprende:
  - SEQ ID NO. 1,
  - 35 - SEQ ID NO. 2,
  - SEQ ID NO. 3,

- SEQ ID NO. 4,
  - SEQ ID NO. 5,
  - SEQ ID NO. 6 y
  - SEQ ID NO. 7.
- 5      4. El método según la reivindicación 2 donde agente farmacológico que bloquea la interacción de la IL2 con la cadena  $\alpha$  de su receptor se selecciona del grupo que comprende:
- un Ac o un fragmento de Ac que se une a la IL2 o a la cadena  $\alpha$  del receptor de IL2,
- 10      - un péptido o una molécula pequeña químicamente definida que se une a la IL2 o a la cadena  $\alpha$  del receptor de IL2 y
- una forma soluble de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL2 o una variante modificada de esta.
- 15      5. El método de la reivindicación 1 donde la tercera etapa se puede realizar al mismo sujeto donador de las células o a uno diferente.
6. El método según la reivindicación 2 donde la señalización a través del IL2R $\beta$  puede ocurrir en diferentes momentos del cultivo de las células o mantenerse *in vitro* e *in vivo*.
- 20      7. El método según las reivindicaciones 1-6 para prolongar la persistencia de las células transferidas y un mayor efecto anti-tumoral *in vitro* e *in vivo*.
8. El método según las reivindicaciones 1-6 en combinación con otras citocinas seleccionadas del grupo que comprende:
- IL12,
  - IL17,
- 25      - IL15 e
- IL21
9. El método según la reivindicación 1 donde los linfocitos T y/o células NK pueden ser cualquiera de las siguientes: una mezcla de células T, células T CD4 o CD8 purificadas, células NK o células NKT.
- 30      10. El método según la reivindicación 1 donde los linfocitos T y/o células NK en la etapa i se pueden obtener de células mononucleares de sangre periférica, del drenaje de los ganglios linfáticos o de infiltrados tumorales.
11. El método según la reivindicación 1 donde los linfocitos T y/o células NK pueden ser adicionalmente ingenierizados para expresar un receptor quimérico de antígeno, un receptor de células T con una especificidad deseada, otros receptores de interés en
- 35      la membrana celular, secretar diferentes citocinas o proteínas solubles de interés.

12. Uso del método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la terapia de transferencia adoptiva de células.
13. Uso de acuerdo a la reivindicación 9 en la obtención de linfocitos infiltrantes de tumor o de receptores quiméricos de células T.
- 5 14. Uso de acuerdo a las reivindicaciones 11-12 en el tratamiento del cáncer.
15. Las células obtenidas según el método de las reivindicaciones 1-6.
16. Un método para el enriquecimiento y expansión *ex vivo* de linfocitos con fenotipo de memoria que comprende:
- a) Obtener la población de linfocitos de un sujeto.
- 10 b) Expandir los linfocitos cultivando las células en condiciones que activen en dichos linfocitos el receptor dimérico de IL2.
17. El método de la reivindicación 16, donde el paso (b) se realiza usando al menos una muteína de IL2.
18. El método de la reivindicación 16, donde el paso (b) se realiza regulando la expresión de al menos una subunidad del receptor de IL2.
- 15 19. El método de la reivindicación 18, donde la subunidad del receptor de IL2 es la alfa (CD25), beta o gamma.
20. El método de la reivindicación 16, donde el paso (b) se realiza inhibiendo la interacción del receptor de IL2 con su proteína cognada.
- 20 21. El método de la reivindicación 20, donde la inhibición de la interacción del receptor de IL2 con su proteína cognada ocurre por la sub-regulación de la subunidad alfa del receptor de la IL2 o por la sobre-regulación de las subunidades beta y gamma.
22. El método de la reivindicación 20, donde la inhibición de la interacción del receptor de IL2 con su proteína cognada ocurre al incubar las células con un anticuerpo anti-CD25.
- 25 23. El método de la reivindicación 16, donde el paso (b) se lleva a cabo transduciendo los linfocitos con un ácido nucleico que codifica para la expresión y secreción de la muteína de IL2.
24. La composición farmacéutica obtenida por cualquiera de las reivindicaciones de la 16-23.
- 30 25. Un método de tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite que comprende la administración de linfocitos con fenotipo de memoria central, dicho método comprende las siguientes etapas:
- a) Obtener la población de linfocitos de un sujeto.
- b) Expandir los linfocitos cultivando las células en condiciones que activen en dichos linfocitos el receptor dimérico de IL2.
- 35 c) Administrar una dosis terapéuticamente efectiva de los linfocitos de la etapa (b) al sujeto.

26. El método de la reivindicación 25, donde la activación del receptor de IL2 dimérico  $\beta\gamma$  comprende incubar dichos linfocitos con la muteína de IL2.
27. El método de la reivindicación 25, donde la activación del receptor de IL2 dimérico  $\beta\gamma$  comprende introducir en dichos linfocitos una secuencia nucleotídica que codifica para la muteína de IL2.
28. El método de la reivindicación 25, donde la activación del receptor de IL2 dimérico  $\beta\gamma$  comprende introducir una secuencia de nucleótidos para sobre-regular la expresión de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor de la IL2 en dichos linfocitos e incubar dichos linfocitos con la IL2 nativa.
29. El método de la reivindicación 25, donde la activación del receptor de IL2 dimérico  $\beta\gamma$  comprende introducir una secuencia de nucleótidos para sub-regulación de la subunidad alfa del receptor de IL2 en dichos linfocitos e incubar dichos linfocitos con la IL2 nativa.
30. El método de la reivindicación 25, donde la activación del receptor de IL2 dimérico  $\beta\gamma$  comprende incubar dichos linfocitos con la IL2 nativa y anticuerpos anti-CD25.