



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 940 607**

⑮ Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2016 PCT/US2016/064861**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17096329**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2016 E 16829013 (8)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2022 EP 3383892**

④ Título: **Receptores químicos modificados y composiciones y métodos relacionados**

⑩ Prioridad:

**03.12.2015 US 201562262911 P
09.06.2016 US 201662348130 P**

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2023

⑦ Titular/es:

**JUNO THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
400 Dexter Avenue North, Suite 1200
Seattle, WA 98109, US**

⑧ Inventor/es:

**THOMPSON, LUCAS, JAMES;
DUBOSE, ROBERT, F. y
BRAHMANDAM, ARCHANA**

⑨ Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 940 607 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

Receptores químéricos modificados y composiciones y métodos relacionados

5 Campo

10 [0001] La presente invención se refiere en algunos aspectos a receptores químéricos para diseñar células para terapia adoptiva, incluidas las células T, y las células modificadas genéticamente. En algunas formas de realización, los receptores químéricos, como los receptores de antígenos químéricos (CAR), se modifican en una región de unión mediante una o más modificaciones de aminoácidos, de modo que los fragmentos peptídicos de dicha región exhiben una menor afinidad de unión por un antígeno leucocitario humano (HLA) y/o la región muestra inmunogenicidad reducida, incluso después de la administración a un sujeto. En algunas formas de realización, la invención se refiere además a composiciones que contienen las células y composiciones para usar en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o afección. En algunas formas de realización, las características de los receptores químéricos y las células manipuladas que contienen los receptores químéricos dan como resultado métodos que proporcionan actividad, eficacia y/o persistencia aumentadas o mejoradas.

15 Antecedentes

20 [0002] Están disponibles varios métodos para la terapia celular adoptiva utilizando células manipuladas que expresan receptores recombinantes, como el receptor de antígeno químérico (CAR). Dichos métodos pueden beneficiarse de una mayor expansión y/o persistencia de las células administradas, reducción de la respuesta inmunitaria a los receptores expresados en las células u otros resultados no deseados. Se proporcionan productos y composiciones que satisfacen tales necesidades.

25 [0003] El documento US 2015/139943 describe ampliamente receptores químéricos en inmunoterapia.

Resumen de la invención

30 [0004] La presente invención proporciona una variante del receptor químérico, que comprende una región de unión modificada que tiene una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos en comparación con una región de unión de un receptor químérico de referencia, en la que:

35 el receptor químérico de referencia comprende una transmembrana CD28 dominio y un dominio de señalización 4-1BB, unidos en una secuencia contigua en una unión, donde la región de unión del receptor químérico de referencia comprende hasta 15 aminoácidos contiguos directamente C-terminal de la unión y/o hasta 15 aminoácidos contiguos directamente N-terminal del empalme; y
40 un fragmento peptídico que tiene la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión modificada tiene una afinidad de unión por una molécula de antígeno leucocitario humano (HLA) que es menor que la afinidad de unión, por la misma molécula HLA, de un fragmento de péptido que tiene la secuencia de la porción correspondiente de la región de unión del receptor químérico de referencia, en el que:
45 la una o más modificaciones comprenden uno o más reemplazos de aminoácidos y los reemplazos de aminoácidos están en uno o más residuos correspondientes a un resto seleccionado de 28, 31 o 34, en el que el(las) reemplazo(s) de aminoácido corresponde(n) o es un reemplazo seleccionado entre K28A, K28H, K28L, K28Q, K28S, R31A, R31H, R31L, R31N, R31S, L34A y L34S, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO: 5, y en donde:

50 el receptor químérico variante comprende una región de unión modificada que comprende menos del 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 137 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % a SEQ ID NO:137 y comprende las modificaciones; y/o el receptor químérico variante comprende una secuencia que comprende menos del 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % a SEQ ID NO:5 y comprende las modificaciones.

55 [0005] La presente invención también proporciona una variante del receptor químérico, que comprende una región de unión modificada que tiene una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos, en la que la variante del receptor químérico comprende desde su terminal N a C en orden: un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana CD28, un dominio coestimulador intracelular 4-1BB y un dominio de señalización citoplasmático activador, en el que el dominio transmembrana y el dominio coestimulador intracelular se unen en secuencia contigua en una unión para formar la región de unión modificada, en el que

60 una o más modificaciones comprenden un (unos) reemplazo(s) de aminoácido y el (los) reemplazo(s) de aminoácido corresponde(n) o es (son) un reemplazo seleccionado entre K28A, K28H, K28L, K28Q, K28S, R31A, R31H, R31L, R31N, R31S, L34A y L34S, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO: 5, en el que el receptor químérico variante comprende una región de unión modificada que comprende menos del 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 137 pero superior al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %,

93 %, 94 %, 95 % o 96 % a SEQ ID NO:137 y comprende las modificaciones; y/o la variante del receptor quimérico comprende una secuencia que comprende menos del 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % a SEQ ID NO:5 y comprende las modificaciones.

5

[0006] La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica la variante del receptor quimérico de la invención.

10

[0007] La presente invención también proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención.

10

[0008] La presente invención también proporciona una célula manipulada que comprende el ácido nucleico de la invención o el vector de la invención o que expresa el receptor quimérico de la invención, opcionalmente en la que la célula es una célula T.

15

[0009] La presente invención también proporciona una composición que comprende las células modificadas genéticamente de la invención y, opcionalmente, un tampón farmacéuticamente aceptable.

20

[0010] En el presente documento se proporciona como parte de la invención reivindicada una variante del receptor quimérico que se modifica en comparación con un receptor quimérico de referencia mediante una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos en una región de unión, siendo dicha región de unión una región que contiene una secuencia contigua de aminoácidos ácidos a cada lado de una unión entre dos dominios, es decir, una región que abarca dos dominios. El receptor quimérico variante incluye una región de unión modificada que tiene una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos en comparación con una región de unión del receptor quimérico de referencia, donde el receptor quimérico de referencia incluye un primer dominio y un segundo dominio, unidos en una secuencia contigua en una unión, donde la región de unión del receptor quimérico de referencia incluye hasta 15 aminoácidos contiguos directamente C-terminal de la unión y/o hasta 15 aminoácidos contiguos directamente N-terminal de la unión; y un fragmento peptídico que tiene la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión modificada tiene una afinidad de unión por una molécula de antígeno leucocitario humano (HLA) que es menor que la afinidad de unión, por la misma molécula HLA, de un péptido fragmento que tiene la secuencia de la porción correspondiente de la región de unión del receptor quimérico de referencia. En algunas formas de realización, el fragmento peptídico de la porción correspondiente de la región de unión del receptor quimérico de referencia tiene una afinidad de unión de menos de 1000 nM, menos de 500 nM o menos de 50 nM.

25

[0011] En algunas formas de realización, el receptor quimérico variante incluye una región de unión modificada que tiene una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos en comparación con una región de unión de un receptor quimérico de referencia, en el que el receptor quimérico de referencia incluye un primer dominio y un segundo dominio, unidos en secuencia contigua en una unión, donde la región de unión del receptor quimérico de referencia incluye hasta 15 aminoácidos contiguos directamente C-terminal de la unión y/o hasta 15 aminoácidos contiguos directamente N-terminal de la unión; y el promedio de las afinidades de unión de los 8-15 fragmentos de aminoácidos, o de los 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 fragmentos de aminoácidos, dentro de la región de unión modificada para una molécula HLA humana es menor que el promedio de las afinidades de unión de todos los fragmentos de 8-15 aminoácidos, o de todos los fragmentos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos, dentro de la región de unión del receptor quimérico de referencia.

35

[0012] En algunas formas de realización, la afinidad de unión o el promedio de afinidades de unión es más de 2 veces, más de 5 veces, más de 10 veces, más de 25 veces, más de 50 veces o más de 100 veces. doblar hacia abajo.

40

[0013] En algunas formas de realización, el receptor quimérico variante incluye una región de unión modificada que tiene una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos en comparación con una región de unión de un receptor quimérico de referencia, en el que el receptor quimérico de referencia incluye un primer dominio directamente unido a un segundo dominio unido en secuencia contigua en una unión, donde la región de unión del receptor quimérico de referencia incluye hasta 15 aminoácidos contiguos directamente C-terminal de la unión y/o hasta 15 aminoácidos contiguos directamente N-terminal de la unión; y el número de fragmentos peptídicos que tienen la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión modificada que tiene una afinidad de unión por un antígeno leucocitario humano (HLA) de menos de 1000 nM se reduce en comparación con el número de fragmentos peptídicos que tienen la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión del receptor quimérico de referencia que tiene la misma afinidad por unirse al mismo HLA.

50

[0014] En algunas formas de realización, se reduce el número de fragmentos peptídicos dentro de la región de unión modificada que muestra una afinidad de unión por un HLA de menos de 500 nM o menos de 50 nM; o la afinidad de unión de menos de 1000 nM es una afinidad de unión de menos de 500 nM o menos de 50 nm. En algunas formas de realización, la afinidad de unión es una CI50 y la comparación de la unión de fragmentos peptídicos de las regiones de unión modificadas y los fragmentos peptídicos de la región de unión del receptor quimérico de referencia es con referencia al mismo péptido estándar.

55

[0015] En algunas formas de realización, el primer dominio y/o el segundo dominio del receptor quimérico de referencia incluyen un dominio de una proteína humana natural; y/o el primer dominio y/o el segundo dominio incluyen un dominio

transmembrana o un dominio de señalización intracelular. En algunas formas de realización, el primer dominio y el segundo dominio del receptor químérico de referencia no están presentes en la misma molécula *in vivo* en un sujeto humano.

5 [0016] En algunas formas de realización, el primer dominio y el segundo dominio del receptor químérico de referencia son, respectivamente, un dominio transmembrana y un dominio de señalización coestimulador intracelular.

[0017] El dominio transmembrana es un dominio transmembrana de CD28 y el dominio de señalización coestimulador es un dominio de señalización 4-1BB.

10 [0018] En algunas formas de realización, la región de unión del receptor químérico de referencia incluye hasta 13 aminoácidos contiguos directamente C-terminales de la unión y/o hasta 15 aminoácidos contiguos directamente N-terminales de la unión. En algunas formas de realización, el(los) fragmento(s) peptídico(s) incluye(n) una secuencia de aminoácidos entre aproximadamente 8 y 15 aminoácidos de longitud, o incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos o al menos aproximadamente o es o tiene aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud.

15 [0019] En algunas formas de realización, el receptor químérico variante incluye un dominio de al menos 95 % de identidad de secuencia con el primer dominio y/o un dominio de al menos 95 % de identidad de secuencia con el segundo dominio, un dominio idéntico en secuencia al primero dominio y un dominio de al menos 95 % de identidad de secuencia con el segundo dominio, o un dominio de al menos 95 % de identidad de secuencia con el primer dominio y un dominio idéntico en secuencia al segundo dominio, donde al menos uno de los dominios presentes en el receptor químérico variante se modifica en comparación con el primer dominio o el segundo dominio del receptor químérico de referencia en la porción que incluye la región de unión modificada.

20 25 [0020] En algunas formas de realización, el receptor químérico variante incluye al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el receptor químérico de referencia; y/o el receptor químérico variante incluye hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 modificaciones de aminoácidos en comparación con el receptor químérico de referencia.

30 35 [0021] En algunas formas de realización, el dominio transmembrana de CD28 incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2, 103 o 104 o una porción funcional o variante de la misma que incluye una secuencia que exhibe al menos un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID N°: 2, 103 o 104; y el dominio de señalización coestimulador 4-1BB incluye la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3 o una porción funcional o variante de la misma que incluye una secuencia que exhibe al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

40 45 [0022] En algunas formas de realización, el primer dominio y el segundo dominio juntos incluyen una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:5. La una o más modificaciones están dentro de una porción entre los residuos 13 y 42 o entre los residuos de aminoácidos 15 y 40, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5. La una o más modificaciones incluyen un reemplazo de aminoácido y/o en el que cada una o más modificaciones incluyen individualmente un reemplazo de aminoácido.

50 55 [0023] El primer y/o segundo dominio del receptor químérico de referencia incluye un dominio transmembrana, en el que una o más modificaciones del receptor químérico variante no son o no incluyen una modificación en o de un residuo de aminoácido hidrofóbico o dentro de una porción hidrófoba en el dominio transmembrana, que es el dominio transmembrana CD28;

60 65 [0024] La una o más modificaciones incluyen uno o más reemplazos de aminoácidos y los reemplazos de aminoácidos están en uno o más residuos seleccionados del residuo de aminoácido 28, 31 o 34 con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5. Los reemplazos de aminoácidos se seleccionan entre K28A, K28H, K28L, K28Q, K28S, R31A, R31H, R31L, R31N, R31S, L34A y L34S, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5. En algunas formas de realización, el reemplazo de aminoácido no incluye el reemplazo de aminoácido individual correspondiente a L34A o L34S, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5. En algunas formas de realización, los reemplazos de aminoácidos se seleccionan entre K28Q/R31A, K28Q/R31N, K28Q/R31S, K28Q/L34A, K28Q/L34S, R31N/L34A, R31N/L34S, K28Q/R31N/L34A, K28Q/R31N/ L34S.

[0025] En algunas formas de realización, la variante del receptor químérico incluye una región de unión modificada que incluye menos del 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 137 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % a SEQ ID NO: 137 e incluye la(s) modificación(es), como cualquiera descrita en este documento; y/o el receptor químérico variante incluye una secuencia que incluye menos del 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % a SEQ ID NO: 5 e incluye la(s) modificación(es), como cualquiera descrita en este documento.

[0026] En algunas formas de realización, el receptor químérico variante incluye una región de unión modificada seleccionada entre: i) la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 138-157 y 184; ii) una variante funcional del mismo que incluye una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o

99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 138-157 y 184 y que incluyen la(s) modificación(es).

5 **[0027]** En algunas formas de realización, la variante del receptor quimérico incluye i) la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 114-134 y 183; ii) una variante funcional del mismo que incluye una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de secuencia de al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 114- 134 y 183 y que incluyen la(s) modificación(es).

10 **[0028]** La región de unión modificada incluye no más de 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos en comparación con la región de unión del receptor quimérico de referencia.

15 **[0029]** En algunas formas de realización, el primer dominio o el segundo dominio es un dominio transmembrana y el dominio correspondiente en el receptor quimérico variante incluye un perfil de hidropatía sustancialmente hidrofóbico y/o tiene un gran promedio positivo de valor de hidropatía (GRAVY). En algunas formas de realización, el valor de GRAVY es mayor que 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2 o mayor.

20 **[0030]** En algunas formas de realización, el primer dominio o el segundo dominio incluyen un dominio de señalización intracelular y el dominio correspondiente en el receptor quimérico variante es capaz de inducir la activación o localización celular de un TRAF y/o es capaz de inducir la señalización mediada por TRAF. En algunas formas de realización, el dominio de señalización intracelular es un dominio de señalización coestimulador 4-1BB y/o el TRAF se selecciona entre TRAF1, TRAF2 o TRAF3. En algunas formas de realización, el receptor quimérico variante incluye los aminoácidos TTQE en las posiciones correspondientes a 49-52 y/o los aminoácidos PEEE en las posiciones correspondientes a los residuos 60-63, cada uno con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5.

25 **[0031]** En algunas formas de realización, el HLA es un HLA de clase I y/o un HLA de clase II. En algunas formas de realización, el alelo HLA de clase I se selecciona de un alelo HLA establecido en la Tabla 1A y/o el alelo HLA de clase II se selecciona de un alelo HLA establecido en la Tabla 1B. En algunas formas de realización, el alelo HLA clase I se selecciona entre HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01 y HLA-B*08:01.

30 **[0032]** En algunas formas de realización, el HLA incluye una pluralidad de moléculas HLA y las afinidades de unión promedio a una o más de la pluralidad de moléculas HLA es menor y/o el número de fragmentos peptídicos que se unen individualmente a una o más de la pluralidad de las moléculas HLA se reducen. En algunas formas de realización, la pluralidad de moléculas HLA se selecciona de una pluralidad de moléculas HLA de clase I que representan más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 95 % o más del 99 % de las moléculas HLA clase I en la población mundial o en la población caucásica; una pluralidad de moléculas HLA clase II que representan más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 95 % o más del 99 % de las moléculas HLA clase II en la población mundial o en la población caucásica; o una pluralidad de moléculas HLA clase I y moléculas HLA clase II que representan más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 95 % o más del 99 % de las moléculas HLA de clase I y las moléculas HLA de clase II en la población mundial o en la población caucásica.

40 **[0033]** La afinidad de unión se puede determinar *in vitro*.

45 **[0034]** En algunas formas de realización, el receptor quimérico variante muestra una inmunogenicidad reducida en comparación con el receptor quimérico de referencia tras la administración a un sujeto humano, opcionalmente en el que el sujeto ha recibido la administración del receptor quimérico de referencia. En algunas formas de realización, la inmunogenicidad reducida incluye una respuesta inmunitaria de células T CD4+ reducida y/o una respuesta inmunitaria de células T CD8+ reducida.

50 **[0035]** En algunas formas de realización, el receptor quimérico de referencia incluye además un dominio de unión a ligando extracelular; y/o el receptor quimérico variante incluye además un dominio de unión a ligando extracelular. En algunas formas de realización, el receptor quimérico variante es un receptor de antígeno quimérico (CAR), en el que el dominio de unión a ligando es un dominio de unión a antígeno. En algunas formas de realización, el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunas formas de realización, el dominio de unión a antígeno es un fragmento de anticuerpo que es un fragmento de cadena sencilla. En algunas formas de realización, el fragmento incluye regiones variables de anticuerpo unidas por un enlazador de inmunoglobulina flexible. En algunas formas de realización, el fragmento de anticuerpo incluye un scFv.

60 **[0036]** En algunas formas de realización, el dominio de unión a ligando se une específicamente a un antígeno que está asociado con una enfermedad o trastorno. En algunas formas de realización, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o afección infecciosa, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria o un tumor o cáncer; el dominio de unión al ligando se une específicamente a un antígeno tumoral; y/o el dominio de unión al ligando se une específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que incluye ROR1, HeR2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA, antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, EPHa2, ErbB2, ErbB3, ErbB4, FBP, receptor fetal de acetilcolina, GD2, GD3, HMWMAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión celular L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1,

MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, antígeno oncofetal, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico, PSMA, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, ephrinB2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, MAGE A3, CE7, Wilms Tumor 1 (WT-1) y ciclina A1 (CCNA1).

- 5 **[0037]** En algunas formas de realización, el receptor quimérico de referencia incluye además un dominio de señalización citoplasmático activador; y/o el receptor quimérico variante incluye además un dominio citoplasmático activador. En algunas formas de realización, el dominio citoplasmático de activación incluye un componente de receptor de células T (TCR) y/o incluye un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM). En algunas formas de realización, el dominio de señalización citoplasmático activador es o incluye un dominio de señalización citoplasmático de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3 ζ) o una variante funcional o porción de señalización del mismo.
- 10 **[0038]** En algunas formas de realización, el receptor quimérico de referencia incluye desde su N-terminal a C en orden: un dominio de unión a ligando extracelular, el primer dominio que es un dominio transmembrana, el segundo dominio que es un dominio coestimulador intracelular y un dominio de señalización citoplasmático activador; y/o el receptor quimérico variante incluye desde su terminal N a C en orden: un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana, un dominio coestimulador intracelular y un dominio de señalización citoplasmático activador, en el que el dominio transmembrana y el dominio coestimulador intracelular se unen en secuencia contigua en una unión para formar la región de unión modificada.
- 15 **[0039]** En el presente documento, como parte de la invención reivindicada, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica la variante del receptor quimérico de la invención. Algunas formas de realización se refieren a un vector que contiene la molécula de ácido nucleico. En algunas formas de realización, el vector es un vector viral. En algunas formas de realización, el vector es un vector retroviral, que opcionalmente es un vector lentiviral o un vector gammaretroviral.
- 20 **[0040]** En el presente documento se proporciona como parte de la invención reivindicada una célula manipulada que incluye el ácido nucleico o el vector de la invención. En algunas formas de realización, la célula manipulada es una célula T. En algunas formas de realización, la célula manipulada es una célula T CD4 $^{+}$ y/o una célula T CD8 $^{+}$.
- 25 **[0041]** En el presente documento se proporciona como parte de la invención reivindicada una composición que incluye las células modificadas genéticamente de la invención y, opcionalmente, un tampón farmacéuticamente aceptable.
- 30 **[0042]** En el presente documento se proporciona como parte de la invención reivindicada una composición según la invención para usar en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o afección. En algunas formas de realización, el receptor quimérico se une específicamente a un ligando o antígeno asociado con la enfermedad o afección. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección es un cáncer, un tumor, una enfermedad o trastorno autoinmune o una enfermedad infecciosa.
- 35 **[0043]** En algunas formas de realización, las células T modificadas genéticamente en la composición exhiben una expansión y/o persistencia aumentada o más prolongada en el sujeto que en un sujeto al que se le administró la misma o aproximadamente la misma cantidad de dosificación de una composición celular de referencia que expresa el receptor quimérico de referencia. En algunas formas de realización, el aumento es de al menos 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces. En algunas formas de realización, el aumento se observa o está presente dentro de un mes, dentro de dos meses, dentro de seis meses o dentro de un año de la administración de las células.
- 40 **45 Breve descripción de los dibujos**
- [0044]**
- 50 **FIG. 1** muestra los resultados de un ensayo de liberación de cromo ejemplar que detecta la presencia de una respuesta inmune citolítica específica para células que expresan CAR después de la administración de células que expresan CAR anti-CD 19 en un sujeto humano. Se muestran los resultados de cultivos de linfocitos mixtos que contienen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de la infusión previa (panel izquierdo) y posterior a la infusión (panel derecho) del sujeto con las células que expresan CAR, en presencia de células que expresan CAR ("CD19-CAR") y sin expresión de CAR ("Simulación"). "E/T" = proporción de células efectoras a diana.
- 55 **FIG. 2** muestra los resultados de un análisis ELISpot ejemplar que confirma respuestas inmunitarias a ciertos péptidos superpuestos que representan regiones particulares de un CAR en un sujeto humano ejemplar. Los números etiquetados con "pep" representan varios péptidos superpuestos a lo largo de la secuencia CAR, con las regiones correspondientes indicadas arriba del gráfico.
- 60 **FIG. 3** muestra un mapa de afinidad de epítopos para las afinidades de unión predichas de péptidos de una región ejemplar de un receptor quimérico para unirse a HLA-A2:01, que incluye una serie de péptidos superpuestos de 8 a 14 miembros de una región de unión ejemplar que tiene una secuencia de aminoácidos CYSLLVTVAIFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF (SEQ ID NO: 6) donde los residuos 1-15 corresponden a un dominio transmembrana CD28 ejemplar y los residuos 16-30 corresponden a un dominio coestimulador 4-1BB ejemplar. La Figura también muestra las afinidades de unión predichas de una serie de péptidos de 8 a 14 miembros superpuestos de una región de unión variante que tiene una secuencia de aminoácidos
- 65

CYSLLTVVAFIIFWVNNKRGKKLLYIFKQPF (SEQ ID NO: 13), que contiene residuos de asparagina insertados entre el dominio transmembrana CD28 y el dominio coestimulador 4-1BB.

FIG. 4A y la **FIG. 4B** representan predicciones de epítopos de células T basadas en algoritmos para alelos HLA clase I y HLA clase II, respectivamente, que muestran el número total de secuencias en el conjunto de datos, incluida cada posición a lo largo de la secuencia con un CI50 previsto de menos de 50 nm ponderado de acuerdo con la frecuencia de los alelos HLA individuales en la población.

FIG. 5 representa predicciones de epítopos de células T basadas en algoritmos para alelos HLA clase I y HLA clase II de una serie de péptidos variantes. Las puntuaciones se determinaron y ponderaron como se describe en el Ejemplo 2. Los triángulos y una línea de puntos indicaron puntuaciones ponderadas de clase I. Los círculos y una línea sólida indican puntuajes ponderados de clase II.

FIG. 6 representa la secuencia de aminoácidos de una secuencia ejemplar de CD28-4-1BB de SEQ ID NO: 5. Los aminoácidos correspondientes al dominio transmembrana de CD28 se indican mediante una línea continua con flechas que indican las posiciones inicial y final; los aminoácidos del dominio coestimulador 4-1BB ejemplar se indican mediante una línea discontinua con flechas que indican las posiciones inicial y final; los aminoácidos de la región de unión ejemplar se indican mediante una línea discontinua y punteada con flechas que indican las posiciones inicial y final y en cursiva. Los dos aminoácidos que flanquean inmediatamente el sitio de unión se indican mediante un recuadro. Los ejemplos de aminoácidos que en algunos casos son objeto de modificación, incluidos K28, R31 y L34, están en negrita y subrayados. Las regiones de residuos ácidos que pueden estar involucradas en la unión y señalización de TRAF mediada por 4-1BB se indican mediante un subrayado doble.

FIG. 7 muestra la unión relativa a varias moléculas MHC Clase II de péptidos de 15 mer superpuestos dentro de una porción de la región que abarca la unión entre el CD28 y la secuencia derivada de 4-1BB (expuesta en SEQ ID NO: 160; la canónica o "secuencia nativa") o dentro de una porción correspondiente que contiene una sustitución R³¹H, R³¹N o L34A (con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO: 5). Se muestra la puntuación REVEAL® para la unión. La puntuación de los alelos HLA clase II individuales se etiquetan individualmente con una letra correspondiente de la siguiente manera: A: DPA1*01:03; DPB1*04:01; B: DR*01:01; DRB1*03:01; C: DR*01:01; DRB1*15:01; D: DR*01:01; DRB1*11:01; E: DPA1*01:03; DPB1*04:02; F: DPA1*01:03; DPB1*03:01; G: DPA1*01:03; DPB1*01:01; H: DPA1*02:01; DPB1*01:01; I: DPA1*02:01; DPB1*04:02; J: DR*01:01; DRB1*11:04; K: DR*01:01; DRB1*01:02; y L: DPA1*02:01; DPB1*15:01.

FIG. 8 muestra una comparación de la unión predicha *in silico* frente a la determinada *in vitro* de un péptido de 15 unidades de la unión CD28-4-1BB a una molécula MHC de clase II.

FIG. 9A y la **FIG. 9B** muestra la expresión de las variantes de CAR que contienen una región de unión modificada en la superficie e intracelularmente, respectivamente, en células T CD4⁺ manipuladas. El eje Y representa la expresión superficial del CAR por detección con un anticuerpo anti-idiotípico (Surface ID). El eje X representa la expresión superficial del marcador sustituto de EGFRt usando un anticuerpo anti-EGFR (Erb).

FIG. 10 muestra la intensidad de fluorescencia media (IFM) determinada por citometría de flujo para la expresión superficial de los CAR en células T CD4⁺ y CD8⁺.

FIG. 11 muestra gráficos de citometría de flujo que representan los niveles intracelulares de IL-2 e IFN-γ en células CD4⁺/CAR+ y células CD8⁺/CAR+.

FIG. 12 muestra la expansión en un ensayo de reestimulación en serie de células modificadas con CAR anti-CD 19 que expresan CAR variantes que contienen una región de unión modificada en comparación con células que expresan CAR con la región de unión nativa.

Descripción detallada

45 A continuación, se describen formas de realización de la invención en algunos de los casos y aspectos.

[0045] A menos que se defina de otra manera, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos o terminología técnica y científica utilizados en el presente documento pretenden tener el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece el tema reivindicado. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen aquí para mayor claridad y/o para facilitar la referencia, y la inclusión de tales definiciones aquí no debe interpretarse necesariamente como una diferencia sustancial sobre lo que generalmente se entiende en la técnica.

[0046] Los encabezados de las secciones utilizados en este documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como una limitación del tema descrito.

I. VISIÓN GENERAL

[0047] Se describen receptores recombinantes, incluidos los receptores químicos, por ejemplo, receptores de antígenos químicos, que presentan una o más diferencias en la secuencia de aminoácidos en comparación con un receptor químico de referencia. En algunos casos, los receptores químicos variantes contienen una región de unión modificada que contiene una o más modificaciones (p. ej., inserciones, delecciones o reemplazos de aminoácidos) en comparación con una región de unión de un receptor químico de referencia, de modo que los fragmentos peptídicos (p. ej., de 8 a 24 aminoácidos de longitud, por ejemplo, de 8 a 15 u 8 a 13 aminoácidos de longitud, tal como aproximadamente u 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud) derivados de la región de unión modificada que presentan menor afinidad de unión por un antígeno leucocitario humano (HLA) en comparación con la unión de fragmentos peptídicos

correspondientes derivados de la región de unión de referencia para el HLA. En algunos casos, la respuesta inmunitaria del huésped, por ejemplo, humoral o mediada por células, al receptor quimérico variante después de la administración al sujeto se reduce en comparación con el receptor quimérico de referencia. En algunos casos, la respuesta inmunitaria reducida es una respuesta inmunitaria detectable reducida contra una región del receptor quimérico variante que contiene la región de unión modificada.

5 [0048] En algunos casos, los receptores quiméricos, como el receptor de antígeno quimérico, contienen uno o más dominios que combinan un dominio de unión a ligando (p. ej., anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que proporciona especificidad para un antígeno deseado (p. ej., antígeno tumoral) con dominios de señalización intracelulares. En algunos 10 casos, el dominio de señalización intracelular es una parte del dominio intracelular activador, tal como un dominio activador de células T, que proporciona una señal de activación primaria. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular contiene o contiene adicionalmente un dominio de señalización coestimulador para facilitar las funciones efectoras. En algunos 15 casos, los receptores quiméricos, cuando se modifican genéticamente en células inmunitarias, pueden modular la actividad de las células T y, en algunos casos, pueden modular la diferenciación u homeostasis de las células T, lo que da como resultado células modificadas genéticamente con una mayor longevidad, supervivencia y/o persistencia *in vivo*. tales como para su uso en métodos de terapia celular adoptiva.

20 [0049] Terapias de células adoptivas (incluidas las que implican la administración de células que expresan receptores quiméricos específicos para una enfermedad o trastorno de interés, como receptores de antígenos quiméricos (CAR) y/u otros receptores de antígenos recombinantes, así como otros receptores de células inmunitarias adoptivas y terapias de 25 células T adoptivas) pueden ser eficaces en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades y trastornos. En ciertos contextos, los enfoques disponibles para la terapia celular adoptiva pueden no ser siempre completamente satisfactorios. En algunos contextos, la eficacia óptima puede depender de la capacidad de las células administradas para reconocer y unirse a un objetivo, por ejemplo, un antígeno objetivo, para traficar, localizar y entrar con éxito en los sitios apropiados dentro del sujeto, los tumores y sus entornos, para convertirse en activarse, expandirse, ejercer diversas funciones efectoras, incluidas la eliminación citotóxica y secreción de varios factores como citoquinas, para persistir, incluso a largo plazo, para diferenciarse, hacer la transición o participar en la reprogramación en ciertos estados fenotípicos (como 30 efector, memoria de larga duración, menos diferenciado, y estados efectores), para proporcionar respuestas de recuerdo eficaces y sólidas después de la eliminación y la reexposición al ligando o antígeno diana, y evitar o reducir el agotamiento, la anergia, la diferenciación terminal y/o la diferenciación en un estado supresor.

35 [0050] En algunos casos, los métodos de terapia adoptiva no son completamente satisfactorios en todos estos aspectos. En algunos aspectos, los casos descritos se basan en observaciones de que la eficacia de la terapia celular adoptiva puede estar limitada por el desarrollo de una respuesta inmunitaria en el sujeto a las células y/o la construcción administrada. Por ejemplo, en algunos casos, la exposición a un receptor quimérico puede verse limitada por las 40 respuestas inmunitarias del huésped contra los receptores recombinantes expresados por las células administradas, lo que puede eliminar prematuramente las células. Se observa que incluso en ciertos sujetos que tienen tumores malignos de células B, que a menudo están inmunocomprometidos, se pueden detectar respuestas inmunitarias que son específicas para regiones de receptores expresados por células administradas en terapia celular adoptiva. Por ejemplo, como se muestra en este documento, los sujetos a los que se les administraron células modificadas genéticamente con un CAR desarrollaron una respuesta inmunitaria específica a una región inmunogénica de la región química que contiene la unión entre el dominio transmembrana y coestimulador del CAR.

45 [0051] En algunos aspectos, el desarrollo de una respuesta inmunitaria puede reducir la exposición o la persistencia de las células T que expresan el receptor quimérico en el curso de los métodos de terapia adoptiva. Sin embargo, las observaciones indican que, en algunos casos, una mayor exposición del sujeto a las células administradas que expresan los receptores recombinantes (p. ej., mayor número de células o duración en el tiempo) puede mejorar la eficacia y los resultados terapéuticos en la terapia celular adoptiva. El análisis preliminar realizado después de la administración de diferentes 50 células T que expresan CAR dirigidas a CD19 a sujetos con varios tipos de cáncer que expresan CD19 en múltiples ensayos clínicos reveló una correlación entre un mayor y/o mayor grado de exposición a las células que expresan CAR y los resultados del tratamiento. Dichos resultados incluyeron la supervivencia y la remisión del paciente, incluso en personas con una carga tumoral grave o significativa.

55 [0052] Además, en algunos casos, una vez que se desarrolla tal respuesta inmune del huésped, ya sea adquirida o innata, puede que no sea factible o efectivo intentar aumentar la exposición o proporcionar un nuevo tratamiento de los sujetos mediante la administración de una dosis posterior de células que expresan el mismo receptor recombinante. Una vez que se ha desarrollado dicha respuesta inmunitaria contra el receptor, la administración de una segunda o posterior dosis de células que expresen el mismo receptor o una con epítopos inmunogénicos similares puede resultar en la eliminación rápida de las células antes de que hayan tenido la oportunidad de expandirse y/o persistir en un grado efectivo o sustancial. 60 Por tanto, sería ventajoso minimizar las respuestas inmunitarias no deseadas que pueden destruir o interferir con la actividad de las células modificadas genéticamente utilizadas en los métodos de terapia celular adoptiva, disminuyendo así la eficacia del tratamiento.

65 [0053] En general, los receptores quiméricos incluyen una pluralidad de dominios diferentes, como una pluralidad de dominios presentes en moléculas endógenas a un sujeto. Por ejemplo, los CAR son moléculas que incluyen un dominio de reconocimiento de antígeno extracelular que se une específicamente a un antígeno diana y un dominio de señalización

intracelular que comprende un ITAM (p. ej., dominio de señalización intracelular CD3-zeta). En algunos casos, el dominio de reconocimiento de antígeno extracelular comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (p. ej., scFv). Un CAR también puede contener un dominio transmembrana y/o un endodomino entre el dominio de reconocimiento extracelular y el dominio de señalización, que puede incluir dominios de señalización transmembrana y/o intracelular de una molécula coestimuladora, como una molécula coestimuladora CD28 o 4-1BB. En algunos casos, dichos dominios pueden conectarse mediante enlazadores.

5 **[0054]** En algunos casos, la pluralidad de dominios normalmente no se encuentran adyacentes entre sí en secuencia en una molécula endógena en un sujeto. Por ejemplo, en algunos casos, un primer dominio y un segundo dominio de un receptor químérico que se unen en una unión pueden crear una secuencia contigua de aminoácidos que pueden no estar presentes en un sujeto, particularmente cuando estos dos dominios no se encuentran de forma natural, adyacentes en la misma proteína y/o están separados por un enlazador sintético. En algunos casos, esto puede resultar en la presencia de una secuencia no nativa que no es idéntica a una secuencia presente en una molécula endógena del huésped en la porción de la secuencia de un receptor químérico, como un CAR, que contiene la unión entre dos dominios.

10 **[0055]** En algunos casos, una región de unión que contiene epítopos peptídicos potenciales que abarcan la unión de los dos dominios puede ser inmunogénica y dar como resultado la generación de una respuesta inmunitaria tras la administración a un sujeto de un receptor químérico que contiene la región de unión. En algunos casos, la región de unión puede incluir, por ejemplo, una vez procesada en relación con la presentación del antígeno para su visualización en una molécula HLA, una pluralidad de fragmentos peptídicos superpuestos individuales de secuencia contigua de aproximadamente 8 a 24 aminoácidos (por ejemplo, 8 a 15 aminoácidos u 8 a 13 aminoácidos, como aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos) directamente C-terminales de la unión que une un primer dominio y un segundo dominio del receptor químérico y/o de aproximadamente 8 a 24 aminoácidos (p. ej., de 8 a 15 aminoácidos o de 8 a 13 aminoácidos, como aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos) directamente N-terminales de la unión, cada uno de cuyos fragmentos peptídicos puede incluir o abarcar la unión de los dos dominios. Por lo tanto, en algunos casos, la región de unión puede contener una pluralidad de epítopos peptídicos potenciales que pueden mostrar una afinidad de unión por una molécula HLA y/o ser capaces de inducir una respuesta inmunitaria.

15 **[0056]** En algunos casos, el fragmento peptídico es reconocido por la respuesta inmunitaria para inducir o iniciar una respuesta inmunitaria detectable, por ejemplo, humoral o mediada por células, contra dicha secuencia peptídica. En algunos casos, el fragmento peptídico puede asociarse o unirse a una molécula MHC expresada en una célula para ser reconocida por un receptor de células T (TCR). En algunos casos, el epítopo peptídico, bajo ciertas condiciones, puede provocar una respuesta inmune en un animal, tal como una respuesta de células T. Por ejemplo, en algunos casos, las células T que expresan un TCR que reconoce un epítopo de células T en el contexto de una molécula MHC pueden estimularse, lo que lleva a respuestas de células T, como proliferación de células T, secreción de linfocinas, respuestas citotóxicas, inflamación local, reacciones, reclutamiento de células inmunitarias adicionales y/o activación de células B que conducen a la producción de anticuerpos contra la proteína que contiene el epítopo peptídico, tal como un receptor químérico. Está dentro del nivel de un experto en la materia identificar un epitopo peptídico de cualquier receptor químérico.

20 **[0057]** En algunos casos, los métodos descritos reducen o disminuyen una respuesta inmunitaria en un sujeto al que se le administran células que expresan la variante del receptor químérico, como CAR, en comparación con la respuesta inmunitaria generada en el sujeto al que se le administran células que expresan el receptor químérico de referencia (sin modificar), tal como CAR de referencia o no modificado. En algunos casos, el sujeto no muestra o muestra una respuesta inmunitaria reducida o un tipo o grado particular de respuesta inmunitaria contra el receptor químérico variante o una región de unión modificada del receptor químérico, como después de la administración de las células que expresan el receptor. El tipo de respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria detectable, una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria mediada por células.

25 **[0058]** En algunos casos, los métodos descritos logran una mayor persistencia de células T manipuladas genéticamente que expresan la variante del receptor químérico, como una variante CAR, cuando se administran a un sujeto. En algunos casos, una célula manipulada genéticamente con una mayor persistencia exhibe una mejor potencia en un sujeto al que se le administra. En algunos casos, la persistencia de células modificadas genéticamente que expresan la variante del receptor químérico, como la variante de células T que expresan CAR, en el sujeto tras la administración es mayor en 30 comparación con la que se lograría mediante métodos alternativos, como los que implican la administración de células manipuladas genéticamente que expresan el receptor químérico de referencia o no modificado. En algunos aspectos, la persistencia de las células administradas aumenta al menos o aproximadamente al menos 1,5 múltiplos, 2 múltiplos, 3 múltiplos, 4 múltiplos, 5 múltiplos, 6 múltiplos, 7 múltiplos, 8 múltiplos, 9 múltiplos, 10 múltiplos, 20 múltiplos, 30 múltiplos, 50 múltiplos, 60 múltiplos, 70 múltiplos, 80 múltiplos, 90 múltiplos o más.

35 **[0059]** En algunos casos, el grado o extensión de la persistencia de las células administradas puede detectarse o cuantificarse después de la administración a un sujeto. Por ejemplo, en algunos aspectos, la PCR cuantitativa (qPCR) se usa para evaluar la cantidad de células que expresan el receptor químérico (p. ej., células que expresan CAR) en la sangre, el suero, el órgano o el tejido (p. ej., el sitio de la enfermedad) del sujeto. En algunos aspectos, la persistencia se cuantifica como copias de ADN o plásmido que codifica el receptor, por ejemplo, CAR, por microgramo de ADN, o como el número de células que expresan el receptor, por ejemplo, CAR, por microlitro de la muestra, por ejemplo, de sangre o

suero, o por número total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o glóbulos blancos o células T por microlitro de la muestra. En algunos casos, también se pueden realizar ensayos de citometría de flujo que detectan células que expresan el receptor usando generalmente anticuerpos específicos para los receptores. Los ensayos basados en células también pueden usarse para detectar el número o porcentaje de células funcionales, como células capaces de unirse y/o neutralizar y/o inducir respuestas, por ejemplo, respuestas citotóxicas, contra células de la enfermedad o afección o que expresan el antígeno reconocido por el receptor. En cualquiera de tales casos, la extensión o nivel de expresión de otro marcador asociado con el receptor recombinante (p. ej., células que expresan CAR) puede usarse para distinguir las células administradas de las células endógenas en un sujeto.

5 **[0060]** También se describen composiciones que contienen la variante del receptor químérico o células modificadas genéticamente que expresan dicha variante del receptor químérico. También se describen métodos para administrar dichas variantes de receptores químéricos y composiciones a sujetos, incluyendo células que expresan variantes de receptores químéricos y composiciones de tales células a sujetos, como para terapia celular adoptiva.

10 **II. RECEPTORES QUÍMÉRICOS VARIANTES**

20 **[0061]** Algunos casos se refieren a receptores químéricos variantes que contienen una región de unión modificada en comparación con una región de unión de un receptor químérico de referencia. En algunos casos, la región de unión es una región que contiene una secuencia contigua de aminoácidos a cada lado de una unión entre un primer y un segundo dominio. En algunos casos, en virtud de una o más modificaciones presentes en la región de unión modificada, el receptor químérico variante contiene un dominio correspondiente al primer dominio del receptor químérico de referencia y/o un dominio correspondiente al segundo dominio del receptor químérico de referencia. que está modificado por una o más diferencias de aminoácidos (por ejemplo, mutaciones).

25 **[0062]** En algunos casos, el receptor químérico variante contiene una región de unión modificada en comparación con una región de unión de un receptor químérico de referencia en el que uno o más residuos de aminoácidos en una posición de 8 a 24 aminoácidos (por ejemplo, de 8 a 15 aminoácidos o 8 a 13 aminoácidos, como aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos) directamente C-terminal de la unión que une un primer dominio y un segundo dominio de la químérica de referencia receptor y/o en una posición de 8 a 24 aminoácidos (p. ej., de 8 a 15 aminoácidos o de 8 a 13 aminoácidos, como aproximadamente u 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos) directamente N-terminal de la unión se modifican, como por inserción, delección o sustitución de aminoácidos. En algunos casos, la variante del receptor químérico contiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 diferencias o modificaciones de aminoácidos en la región de unión modificada en comparación con la región de unión en el receptor químérico de referencia.

35 **[0063]** En algunos casos, el receptor químérico variante contiene un dominio de al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el primer dominio del receptor químérico de referencia y/o contiene un dominio de al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el segundo dominio del receptor químérico de referencia. En algunos casos, el receptor químérico variante contiene un dominio que es idéntico en secuencia al primer dominio del receptor químérico de referencia y contiene un dominio de al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el segundo dominio del receptor químérico de referencia. En algunos casos, la variante del receptor químérico contiene un dominio de al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con el primer dominio del receptor químérico de referencia y contiene un dominio que es idéntico en secuencia al segundo dominio del receptor químérico de referencia. En algunos casos, al menos uno o ambos dominios presentes en el receptor químérico variante se modifican en comparación con el primer dominio y/o el segundo dominio del receptor químérico de referencia en la parte que contiene la región de unión modificada.

50 **[0064]** En algunos casos, el receptor químérico variante tiene al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con el receptor químérico de referencia. En algunos casos, la variante del receptor químérico contiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 diferencias o modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, inserciones, delecciones o reemplazos de aminoácidos) en comparación con el receptor químérico de referencia.

55 **[0065]** En algunos casos, el primer y/o segundo dominio del receptor químérico de referencia (p. ej., CAR de referencia) es un dominio de una proteína humana endógena natural o un dominio que tiene una identidad del 100 % con un dominio o una parte funcional del mismo de una proteína humana natural. o proteína endógena. En algunos casos, el primer dominio y el segundo dominio no están presentes en la misma molécula *in vivo* en un sujeto humano. En algunos casos, el primer dominio y el segundo dominio no están presentes en una sola proteína o polipéptido humano natural o endógeno.

60 **[0066]** En algunos casos, el primer y/o segundo dominio es o comprende un dominio de unión extracelular, un dominio bisagra, un dominio transmembrana o un dominio de señalización intracelular o partes funcionales del mismo. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular es o comprende un dominio de señalización coestimulador, tal como un dominio de señalización coestimulador CD28, 4-1BB o ICOS. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular es o comprende un dominio de señalización citoplasmática activador, tal como un dominio que es o incluye un componente

de receptor de células T (TCR) y/o que contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM). En algunos casos, el dominio citoplasmático de activación es o comprende un dominio de señalización citoplasmático de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3 ζ) o una variante funcional o porción de señalización del mismo.

5 **[0067]** En algunos casos, el receptor quimérico de referencia es un CAR. En algunos casos, los receptores quiméricos, como CAR, contienen desde su N-terminal hasta su C-terminal en orden: un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular es o incluye un dominio de señalización de activación (por ejemplo, un componente de TCR y/o que contiene un ITAM, por ejemplo, un dominio de señalización de CD3-zeta). En algunos casos, el dominio de señalización intracelular es o incluye un dominio de señalización coestimulador (por ejemplo, un dominio de señalización CD28, 4-1BB o ICOS). En algunos casos, el dominio de señalización intracelular contiene solo uno del dominio de señalización coestimulador o el dominio de señalización activador o contiene ambos dominios en cualquier orden. En algunos casos, el dominio de señalización intracelular contiene tanto el dominio de señalización coestimulador como el dominio de señalización activador.

15 **[0068]** En algunos casos, el receptor quimérico de referencia contiene una región de unión de un primer y segundo dominio que es inmunogénica. En algunos casos, la región inmunogénica incluye uno o más epítopos peptídicos (también denominado epítopo de células T). En algunos casos, una región de unión que contiene epítopos peptídicos potenciales que abarcan la unión de los dos dominios puede ser inmunogénica y dar como resultado la generación de una respuesta inmunitaria tras la administración a un sujeto de un receptor quimérico que contiene la región de unión. En algunos casos, la región de unión puede incluir, por ejemplo, una vez procesada en relación con la presentación del antígeno para su visualización en una molécula HLA, una pluralidad de fragmentos peptídicos superpuestos individuales de secuencia contigua de aproximadamente 8 a 24 aminoácidos (por ejemplo, 8 a 15 aminoácidos u 8 a 13 aminoácidos, como aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos) directamente C-terminales de la unión que une un primer dominio y un segundo dominio del receptor quimérico y/o de aproximadamente 8 a 24 aminoácidos (p. ej., de 8 a 15 aminoácidos o de 8 a 13 aminoácidos, como aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos) directamente N-terminales de la unión, cada uno de cuyos fragmentos peptídicos puede incluir o abarcar la unión de los dos dominios. Por lo tanto, en algunos casos, la región de unión puede contener una pluralidad de epítopos peptídicos potenciales que pueden mostrar una afinidad de unión por una molécula HLA y/o ser capaces de inducir una respuesta inmunitaria.

20 **[0069]** En algunos casos, se puede identificar una región inmunogénica, tal como una región de unión, de un receptor quimérico. En algunos casos, la región inmunogénica puede identificarse por su capacidad para unirse a una molécula MHC o por su capacidad para provocar una respuesta inmunitaria en determinadas condiciones. En algunos casos, los péptidos superpuestos de un receptor quimérico, como los péptidos superpuestos de 8 a 20 mer, como 9mers, 10mers, 11mers, 12mers, 13mers, 14mers o 15mers se pueden evaluar para determinar la unión al MHC utilizando métodos algorítmicos u otros métodos computacionales, como descrito abajo. En algunos casos, se puede evaluar un receptor quimérico para determinar si es inmunogénico evaluando una respuesta inmunitaria en un sujeto al que se le ha administrado, como un sujeto al que se le administraron células modificadas genéticamente con el receptor quimérico (por ejemplo, CAR). A continuación, se describen métodos ejemplares para evaluar las respuestas inmunitarias.

25 **[0070]** En algunos casos, el al menos un epítopo peptídico es capaz de unirse a un complejo principal de histocompatibilidad (MHC), tal como una proteína de clase I o clase II, que son moléculas que contienen un sitio de unión de péptido polimórfico o un surco de unión que puede, en algunos casos, formar complejos con fragmentos peptídicos de polipéptidos, incluidos los péptidos procesada por la maquinaria celular. En algunos casos, el epítopo peptídico es capaz de unirse a una molécula de MHC que es una molécula de MHC humana. En algunos casos, la molécula MHC es una molécula de antígeno leucocitario humano (HLA). En algunos casos, el al menos un epítopo peptídico exhibe una afinidad de unión (por ejemplo, CI50) por una molécula HLA, tal como una molécula HLA de clase I o una molécula HLA de clase II. En algunos casos, la región de unión del receptor quimérico de referencia contiene un epítopo peptídico que presenta una afinidad de unión inferior a 1000 nM, inferior a 500 nM o inferior a 50 nM.

30 **[0071]** En algunos casos, al menos uno o más epítopos peptídicos de una región de unión de un receptor quimérico de referencia es un epítopo MHC de clase II. En algunos casos, los péptidos que se unen a las moléculas MHC de clase II pueden tener entre 8 y 20 aminoácidos de longitud, incluidos entre 10 y 17 aminoácidos de longitud, como al menos o al menos o aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 aminoácidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 15 aminoácidos de longitud. En algunos casos, los péptidos que se unen a las moléculas MHC de clase II pueden tener más de 20 aminoácidos. En algunos casos, el péptido se encuentra en una conformación extendida a lo largo del surco de unión al péptido MHC II. En algunos casos, el surco de unión al péptido MHC II está abierto en ambos extremos. En algunos casos, el péptido se mantiene en su lugar, al menos en parte, por los contactos del átomo de la cadena principal con los residuos conservados que recubren el surco de unión del péptido. En algunos casos, el MHC de clase II es un dímero $\alpha\beta$ que puede ser o incluir cualquier proteína alélica del MHC de clase II que se sepa que está presente en un sujeto, tal como un sujeto humano. En algunos casos, el alelo MHC puede ser, entre otros, DR1, DR3, DR4, DR7, DR52, DQ1, DQ2, DQ4, DQ8 y DP1. En algunos casos, el alelo del MHC de clase II puede ser cualquiera de los expuestos en las Tablas 1B, incluidas las asociaciones alfa y beta de isotipos coincidentes o heterodímeros de isotipos mixtos que combinan cadenas alfa y beta de diferentes alelos. En algunos casos, el MHC clase II puede ser un dímero que es o incluye un alelo alfa y/o beta de entre HLA-DPA1*0103, HLA-DPA1*0201, HLA-DPB1*0101, HLA-DPB1*0301, HLA -

DPB1*0401, HLA-DPB*0402, HLA-DPB1*1501, HLA- DRB*0101, HLADRB1*0101, HLA-DRB1*0102, HLA-DRB*0301, HLA-DRB*0701, HLA-DRB*1, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1104, HLA-DRB*1501 y/o HLA-DQB1*0201.

[0072] En algunos casos, el al menos un epítopo peptídico de una región de unión de un receptor quimérico de referencia es un epítopo MHC de clase I. En algunos casos, los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I pueden tener entre 7 y 15 aminoácidos de longitud. En algunos casos, los péptidos que se unen a la molécula MHC de clase I pueden tener entre 8 y 13 aminoácidos de longitud. En algunos casos, la unión del péptido se estabiliza en sus dos extremos por contactos entre átomos en la cadena principal del péptido y sitios invariables en el surco de unión del péptido de todas las moléculas del MHC de clase I. En algunos casos, hay sitios invariantes en ambos extremos del surco que se unen a los extremos amino y carboxi del péptido. En algunos casos, las variaciones en la longitud del péptido pueden acomodarse mediante una torcedura en el esqueleto del péptido. En algunos casos, la torcedura incluye residuos de prolina o glicina, que pueden permitir flexibilidad. En algunos casos, el alelo MHC de clase I puede ser cualquiera que se sepa que está presente en un sujeto, tal como un sujeto humano. En algunos casos, el alelo MHC de clase I es un alelo HLAA2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-A28, HLA-A31, HLA-A33, HLA-A34, HLA-B7, HLA-B45 o HLA-Alelo Cw8. En algunos casos, el alelo del MHC de clase I puede ser cualquiera de los expuestos en las Tablas 1A, que se encuentran entre los alelos del MHC de clase I más frecuentes (Solberg et al., (2008) *Hum Immunol.* 2008 Jul; 69(7):443-6). En algunos casos, el alelo HLA clase I es HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01 o HLA-B*08:01.

[0073] En algunos casos, el alelo MHC de clase I es un alelo HLA-A2, que en algunas poblaciones lo expresa aproximadamente el 50 % de la población. En algunos casos, el alelo HLA-A2 puede ser un producto del gen HLA-A*0201,*0202,*0203,*0206 o*0207. En algunos casos, puede haber diferencias en la frecuencia de subtipos entre diferentes poblaciones. Por ejemplo, en algunos casos, más del 95 % de la población caucásica positiva para HLA-A2 es HLA-A*0201, mientras que en la población china se ha informado que la frecuencia es de aproximadamente 23 % HLA-A*0201, 45 % HLAA*0207, 8 % HLA-A*0206 y 23 % HLA-A*0203. En algunos casos, la molécula MHC es HLA-A*0201.

[0074] En algunos casos, el receptor quimérico variante puede contener desde su N-terminal hasta su C-terminal en orden: un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular, que opcionalmente puede incluir un dominio de señalización coestimulador (por ejemplo, CD28, 4-1BB o ICOS) y/o un dominio de señalización activador (por ejemplo, un componente de TCR y/o que contiene un ITAM, por ejemplo, un dominio de señalización de CD3-zeta) cada uno solo como parte del dominio de señalización intracelular o en cualquier orden, en el que el receptor quimérico variante contiene una modificación en uno o más residuos de aminoácidos dentro de una porción contigua de 8 a 24 aminoácidos (por ejemplo, 8 a 15 aminoácidos o 8 a 13 aminoácidos, tales como aproximadamente u 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos) a cada lado (N-terminal y/o C-terminal) de la unión.

[0075] En algunos casos, las características de un receptor quimérico de referencia pueden ser cualquiera de las descritas en la subsección 1 a continuación. En algunos casos, las características de una variante del receptor quimérico también pueden ser cualquiera de las descritas en la subsección 1 a continuación, excepto que la variante del receptor quimérico contiene una o más modificaciones (por ejemplo, inserciones, delecciones o reemplazos) en una región de unión modificada como se describe.

1. Receptores quiméricos

[0076] Los ejemplos de receptores recombinantes, incluidos los CAR y los TCR recombinantes, así como los métodos para diseñar e introducir los receptores en las células, incluyen los descritos, por ejemplo, en los números de publicación de solicitud de patente internacional WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061 Solicitud de Publicación de Patente de EE. UU. N°s US2002131960, US2013287748, US20130149337, Patente de EE. UU. N°s: 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319. 2013 abril; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle y col., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 octubre; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cáncer*, 18 de marzo de 2012 (2): 160-75. En algunos casos, los receptores de antígeno modificados genéticamente incluyen un CAR como se describe en la Patente de EE. UU. N° 7,446,190 y los descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO/2014055668 A1. En algunos casos, pueden emplearse métodos similares para la construcción e introducción o transferencia en células inmunitarias.

[0077] En algunos casos, el receptor quimérico incluye un dominio de unión a ligando que se une, como se une específicamente, a un antígeno (o un ligando). Entre los antígenos a los que se dirigen los receptores quiméricos se encuentran los expresados en el contexto de una enfermedad, afección o tipo de célula a los que se dirige la terapia celular adoptiva. Entre las enfermedades y afecciones se encuentran enfermedades y trastornos proliferativos, neoplásicos y malignos, incluidos cánceres y tumores, incluidos cánceres hematológicos, cánceres del sistema inmunitario, como linfomas, leucemias y/o mielomas, como B, T y leucemias mieloídes, linfomas y mielomas múltiples. En algunos casos, el antígeno (o un ligando) es un polipéptido. En algunos casos, es un carbohidrato u otra molécula. En algunos casos, el antígeno (o un ligando) se expresa selectivamente o se sobreexpresa en células de la enfermedad o afección, por ejemplo, células tumorales o patógenas, en comparación con células o tejidos normales o no diana. En otros casos, el antígeno se expresa en células normales y/o se expresa en células manipuladas. En algunos casos, el antígeno (o un ligando) es un antígeno tumoral o un marcador de cáncer. En algunos casos, el antígeno (o un ligando) es o incluye el receptor de tirosina quinasa huérfano ROR1, tEGFR, Her2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, BCMA, mesotelina, CEA y antígeno de superficie de la hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-

- 4, EPHa2, ErbB2, 3 o 4, FBP, receptor fetal de acetilcolina e, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22Ralfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión celular L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, oncofetal antígeno, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembionario (CEA), antígeno prostático específico, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógeno, receptor de progesteron, ephrinB2, CD123, CS-1, c-Met, 5 GD-2 y MAGE A3, CE7, Tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, como la ciclina A1 (CCNA1), y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos. En algunos casos, el antígeno es un antígeno específico de un patógeno. En algunos casos, el antígeno es un antígeno viral (tal como un antígeno viral de VIH, VHC, VHB, etc.), antígenos bacterianos y/o antígenos parásitarios.
- 10 [0078] En algunos casos, el receptor químérico se construye con una especificidad para un antígeno particular (o marcador o ligando), tal como un antígeno expresado en un tipo de célula particular para ser el objetivo de una terapia adoptiva, por ejemplo, un marcador de cáncer, y/o un antígeno destinado a inducir una respuesta amortiguadora, tal como un antígeno expresado en un tipo de célula normal o no enferma. Por lo tanto, el receptor químérico normalmente incluye en su porción extracelular uno o más dominios de unión a ligandos.
- 15 [0079] En algunos casos, el receptor químérico es un CAR. En algunos casos, el CAR incluye típicamente en su porción extracelular una o más moléculas de unión a antígeno, tales como uno o más fragmentos, dominios o porciones de unión a antígeno, o uno o más dominios variables de anticuerpos y/o moléculas de anticuerpos. En algunos casos, el CAR incluye una porción o porciones de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo, como un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFv) derivado de las cadenas variable pesada (VH) y variable ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal (mAb).
- 20 [0080] El término "anticuerpo" en el presente documento se utiliza en el sentido más amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, incluidos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos funcionales (de unión a antígeno), incluidos fragmentos de unión a antígeno (Fab), fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fv, fragmentos de IgG recombinante (rlgG), regiones de cadena pesada variable (VH) capaces de unirse específicamente al antígeno, fragmentos de anticuerpos de cadena única, incluidos fragmentos variables de cadena única (scFv) y fragmentos de anticuerpos de dominio único (*p. ej.*, sdAb, sdFv, nanocuerpo). El término abarca formas de inmunoglobulinas diseñadas genéticamente y/o modificadas de otro modo, tales como intracuerpos, pepticuerpos, anticuerpos químéricos, anticuerpos 25 totalmente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados, multiespecíficos, *p. ej.*, biespecíficos, anticuerpos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, tandem di-scFv, tandem tri-scFv. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "anticuerpo" abarca fragmentos de anticuerpos funcionales del mismo. El término también 30 abarca anticuerpos intactos o de longitud completa, incluidos anticuerpos de cualquier clase o subclase, incluidas IgG y subclases de las mismas, IgM, IgE, IgA e IgD.
- 35 [0081] En algunos casos, las proteínas de unión a antígeno, los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno reconocen específicamente un antígeno de un anticuerpo de longitud completa. En algunos casos, las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo pueden ser de longitud completa o pueden ser una porción de unión a antígeno (un Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv)). En otros casos, la región constante de la cadena pesada del anticuerpo 40 se elige entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE, particularmente entre, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, más particularmente, IgG1 (por ejemplo, IgG1 humana). En otro caso, la región constante de la cadena ligera del anticuerpo se elige entre, por ejemplo, kappa o lambda, particularmente kappa.
- 45 [0082] Entre los anticuerpos se encuentran fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; regiones de cadena pesada variable (VH), moléculas de anticuerpo de cadena sencilla tales como scFv y anticuerpos únicos VH de dominio único; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En casos particulares, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos monocatenarios que comprenden una región de cadena pesada variable y/o una región de cadena ligera variable, como scFvs.
- 50 [0083] El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, y cada dominio comprende cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres CDR. (Ver, por ejemplo, Kindt et al. Kuby Immunology, 6^a ed., WH Freeman and Co., página 91 (2007). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un ζ antígeno particular se pueden aislar utilizando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para seleccionar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. 55 Véase, por ejemplo, Portolano et al., J. Immunol. 150: 880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).
- 60 [0084] Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de la cadena ligera. dominio de un anticuerpo. En ciertos casos, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano. En algunos casos, el CAR comprende un dominio de cadena pesada de anticuerpo que se une específicamente al antígeno, como un marcador de cáncer o un antígeno de superficie celular de una célula o enfermedad a la que se va a dirigir, como una célula tumoral o

una célula cancerosa, como cualquiera de las células diana antígenos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

5 **[0085]** Los fragmentos de anticuerpos pueden fabricarse mediante diversas técnicas, que incluyen, entre otras, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes. En algunos casos, los anticuerpos son fragmentos producidos de forma recombinante, como fragmentos que comprenden arreglos que no se producen de forma natural, como aquellos con dos o más regiones o cadenas de anticuerpos unidas por enlazadores sintéticos, por ejemplo, enlazadores peptídicos, y/o que pueden no ser compatibles, producidos por la digestión enzimática de un anticuerpo intacto de origen natural. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpos son

10 scFv.

15 **[0086]** Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo en el que todos o sustancialmente todos los residuos de aminoácidos de CDR derivan de CDR no humanas y todos o sustancialmente todos los residuos de aminoácidos de FR derivan de FR humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo no humano se refiere a una variante del anticuerpo no humano que se ha humanizado, normalmente para reducir la inmunogenicidad para los humanos, al tiempo que conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo original no humano. En algunos casos, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de CDR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

20 **[0087]** En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, scFv) que reconoce específicamente un antígeno, como un antígeno intacto, expresado en la superficie de una célula.

25 **[0088]** En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo similar a TCR, como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, scFv) que reconoce específicamente un antígeno intracelular, como un antígeno asociado a un tumor, presentado en la célula, superficie como un complejo MHC-peptido. En algunos casos, un anticuerpo o una parte del mismo que se une al antígeno que reconoce un complejo MHC-peptido puede expresarse en células como parte de un receptor recombinante, tal como un receptor de antígeno. Entre los receptores de antígenos se encuentran los 30 receptores de antígenos no TCR funcionales, como los receptores de antígenos quiméricos (CAR). En general, un CAR que contiene un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que muestra una especificidad similar a TCR dirigida contra complejos de peptido-MHC también puede denominarse CAR similar a TCR.

35 **[0089]** En algunos casos, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un complejo MHC-peptido, puede producirse inmunizando a un huésped con una cantidad eficaz de un inmunógeno que contiene un complejo MHC-peptido específico. En algunos casos, el péptido del complejo MHC-peptido es un epítopo de antígeno capaz de unirse al MHC, como un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral universal, antígeno de mieloma u otro antígeno como se describe a continuación. En algunos casos, se administra una cantidad eficaz del inmunógeno a un huésped para provocar una respuesta inmunitaria, en el que el inmunógeno conserva una forma 40 tridimensional del mismo durante un período de tiempo suficiente para provocar una respuesta inmunitaria contra la presentación tridimensional del péptido en el surco de unión de la molécula MHC. A continuación, se analiza el suero recogido del huésped para determinar si se están produciendo los anticuerpos deseados que reconocen una presentación tridimensional del péptido en el surco de unión de la molécula MHC. En algunos casos, los anticuerpos producidos pueden 45 evaluarse para confirmar que el anticuerpo puede diferenciar el complejo MHC-peptido de la molécula MHC sola, el péptido de interés solo y un complejo de MHC y un péptido irrelevante. A continuación, se pueden aislar los anticuerpos deseados.

50 **[0090]** En algunos casos, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un complejo MHC-peptido se puede producir empleando métodos de presentación de bibliotecas de anticuerpos, tales como bibliotecas de anticuerpos de fagos. En algunos casos, se pueden generar bibliotecas de expresión en fagos de Fab mutante, scFv u otras formas de anticuerpos, por ejemplo, en las que los miembros de la biblioteca están mutados en uno o más residuos de una CDR o CDR. Se conocen ejemplos de tales métodos en la técnica (ver, por ejemplo, solicitud publicada de EE. UU. N° US20020150914, US2014/0294841; y Cohen CJ. et al. (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332).

55 **[0091]** En algunos casos, la porción extracelular del CAR, como una porción de anticuerpo del mismo, incluye además un espaciador, como una región espaciadora entre el componente de reconocimiento de antígeno, por ejemplo, scFv, y un dominio transmembrana. El espaciador puede ser o incluir al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina o una variante o versión modificada de la misma, como una región bisagra, por ejemplo, una región bisagra de IgG4 y/o una región CH1/CL y/o Fc. En algunos casos, la porción o región constante es una IgG humana, como IgG4 o IgG1. El espaciador puede tener una longitud que proporcione una mayor capacidad de respuesta de la célula después de la unión al antígeno, en comparación con la ausencia del espaciador. En algunos ejemplos, el espaciador tiene una longitud de aproximadamente 12 aminoácidos o no tiene más de 12 aminoácidos de longitud. Los espaciadores ejemplares incluyen aquellos que tienen al menos aproximadamente 10 a 229 aminoácidos, aproximadamente 10 a 200 aminoácidos, aproximadamente 10 a 175 aminoácidos, aproximadamente 10 a 150 aminoácidos, aproximadamente 10 a 125 aminoácidos, aproximadamente 10 a 100 aminoácidos, aproximadamente 10 a 75 aminoácidos, aproximadamente 10 a 50 aminoácidos, aproximadamente 10 a 40 aminoácidos, aproximadamente 10 a 30 aminoácidos, aproximadamente 10

5 a 20 aminoácidos, o aproximadamente 10 a 15 aminoácidos, e incluyendo cualquier número entero entre los puntos finales de cualquiera de los rangos enumerados. En algunos casos, una región espaciadora tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos, aproximadamente 119 aminoácidos o menos, o aproximadamente 229 aminoácidos o menos. Los espaciadores ejemplares incluyen la bisagra de IgG4 sola, la bisagra de IgG4 unida a los dominios CH2 y CH3, o la bisagra de IgG4 unida al dominio CH3. Los espaciadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a los descritos en Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153. número de publicación de solicitud de patente internacional WO2014031687, o Patente de EE. UU. Nº 8,822,647 o aplicación publicada. Nº US2014/027163 5.

10 [0092] En algunos casos, la región o porción constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia ESKYGPPCPCP (establecida en SEQ ID NO: 1) y está codificado por la secuencia establecida en SEQ ID NO: 158. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 158. NO: 107. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 108. En algunos casos, la región o porción constante es de IgD. En algunos casos, el espaciador tiene la secuencia establecida en SEQ ID NO: 109. En algunos casos, el espaciador tiene una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 15 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 107, 108 o 109.

20 [0093] La unión del ligando extracelular, como el dominio de reconocimiento de antígeno, generalmente está vinculada a uno o más componentes de señalización intracelular, como componentes de señalización que imitan la activación a través de un complejo receptor de antígeno, como un complejo TCR, en el caso de un CAR, y/o señal a través de otro receptor de superficie celular. En algunos casos, un dominio transmembrana une los dominios de señalización intracelular y de unión al ligando extracelular. En algunos casos, CAR incluye un dominio transmembrana fusionado con el dominio extracelular. En un caso, se usa un dominio transmembrana que está asociado naturalmente con uno de los dominios en el receptor, por ejemplo, CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o modifica por sustitución de 25 aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de los mismos o diferentes proteínas de membrana superficial para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

30 [0094] El dominio transmembrana en algunos casos se deriva de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio en algunos aspectos se deriva de cualquier proteína transmembrana o unida a la membrana. Las regiones transmembrana incluyen las derivadas de (es decir, comprenden al menos la(s) región(es) transmembrana(s) de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154 y/o regiones transmembrana que contienen variantes funcionales de las mismas tales como aquellas que conservan una parte sustancial de sus propiedades estructurales, p. ej., transmembrana. En algunos casos, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana derivado de CD4, CD28 o CD8, por ejemplo, CD8 alfa, o una variante funcional del mismo. Alternativamente, el dominio transmembrana en algunos casos es sintético. En algunos aspectos, el dominio transmembrana sintético comprende residuos predominantemente hidrofóbicos tales como leucina y valina. En algunos aspectos, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. En algunos casos, el enlace se realiza mediante enlazadores, 35 espaciadores y/o dominio(s) transmembrana.

40 [0095] Entre los dominios de señalización intracelular están aquellos que imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo. En algunos casos, está presente un enlazador oligopeptídico o polipeptídico corto, por ejemplo, un enlazador de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, como uno que contiene glicinas y serinas, por ejemplo, el doblete de glicina-serina, y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del CAR.

50 [0096] El receptor, por ejemplo, el CAR, generalmente incluye al menos un componente o componentes de señalización intracelular. En algunos casos, el receptor incluye un componente intracelular de un complejo TCR, como una cadena TCR CD3 que media en la activación y citotoxicidad de las células T, por ejemplo, la cadena zeta CD3. Por tanto, en algunos aspectos, la porción de unión a antígeno está unida a uno o más módulos de señalización celular. En algunos casos, los módulos de señalización celular incluyen el dominio transmembrana de CD3, los dominios de señalización intracelular de CD3 y/u otros dominios transmembrana de CD. En algunos casos, el receptor, por ejemplo, CAR, incluye además una porción de una o más moléculas adicionales, como el receptor Fc y, CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, 55 en algunos aspectos, el CAR u otro receptor químérico incluye una molécula químérica entre CD3-zeta (CD3- ζ) o receptor Fc y y CD8, CD4, CD25 o CD16.

60 [0097] En algunos casos, tras la unión del CAR u otro receptor químérico, el dominio citoplasmico o el dominio de señalización intracelular del receptor activa al menos una de las funciones o respuestas efectoras normales de la célula inmunitaria, p. ej., célula T diseñada para expresar el CAR. Por ejemplo, en algunos contextos, CAR induce una función de una célula T, como la actividad citolítica o la actividad de los T colaboradores, como la secreción de citocinas u otros factores. En algunos casos, se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora en lugar de una cadena inmunoestimuladora intacta, por ejemplo, si transduce la señal de función efectora. En algunos casos, el dominio o dominios de señalización intracelular incluyen las secuencias citoplasmicas del receptor de células T (TCR) y, en algunos aspectos, también las de los correceptores que, 65 en el contexto natural, actúan en concierto con dichos receptores para iniciar la transducción de señales después del

compromiso del receptor de antígeno.

[0098] En el contexto de un TCR natural, la activación completa generalmente requiere no solo la señalización a través del TCR, sino también una señal coestimuladora. Por lo tanto, en algunos casos, para promover la activación completa, 5 también se incluye en el CAR un componente para generar una señal secundaria o coestimuladora. En otros casos, el CAR no incluye un componente para generar una señal coestimuladora. En algunos aspectos, se expresa un CAR adicional en la misma célula y proporciona el componente para generar la señal secundaria o coestimuladora.

[0099] La activación de células T se describe en algunos aspectos como mediada por dos clases de secuencias de 10 señalización citoplasmáticas: aquellas que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y aquellas que actúan de manera independiente de antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias). En algunos aspectos, el CAR incluye uno o ambos componentes de señalización.

[0100] En algunos aspectos, CAR incluye una secuencia de señalización citoplasmática primaria que regula la activación 15 primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de forma estimulante pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores o ITAM. Los ejemplos de secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que contienen ITAM incluyen las derivadas de TCR zeta, FcR gamma, CD3 gamma, CD3 delta y CD3 epsilon. En algunos casos, la(s) 20 molécula(s) de señalización citoplasmática en el CAR contiene(n) un dominio de señalización citoplasmática, una parte del mismo o una secuencia derivada de CD3 zeta.

[0101] En algunos casos, CAR incluye un dominio de señalización y/o una porción transmembrana de un receptor 25 coestimulador, como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. En algunos aspectos, el mismo CAR incluye tanto el componente activador como el coestimulador.

[0102] En algunos casos, el dominio de activación se incluye dentro de un CAR, mientras que el componente 30 coestimulador lo proporciona otro CAR que reconoce otro antígeno. En algunos casos, las CAR incluyen CAR activadoras o estimulantes, CAR coestimuladoras, ambas expresadas en la misma célula (ver WO2014/055668). En algunos aspectos, las células incluyen uno o más CAR estimuladores o activadores y/o un CAR coestimulador. En algunos casos, las células incluyen además CAR inhibidores (iCAR, véase Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (diciembre de 2013), como un CAR que reconoce un antígeno distinto del asociado con y/o específico para la enfermedad o afección 35 mediante el cual una señal de activación suministrada a través del CAR dirigido a la enfermedad se reduce o inhibe mediante la unión del CAR inhibidor a su ligando, por ejemplo, para reducir los efectos fuera del objetivo.

[0103] El componente de señalización del receptor recombinante, como CAR, comprende un dominio intracelular CD3 zeta y una región de señalización coestimuladora. En ciertos casos, el dominio de señalización intracelular comprende una transmembrana CD28 y un dominio de señalización unido a un dominio intracelular CD3 (p. ej., CD3-zeta). En algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores químéricos CD28 y CD137 (4-1BB, 40 TNFRSF9), unidos a un dominio intracelular CD3 zeta.

[0104] En algunos casos, el CAR abarca uno o más, por ejemplo, dos o más dominios coestimuladores y un dominio de activación, por ejemplo, dominio de activación primario, en la porción citoplásica. Los CAR ejemplares incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.

[0105] En algunos casos, el CAR u otro receptor de antígeno incluye además un marcador, como un marcador de superficie celular, que puede usarse para confirmar la transducción o ingeniería de la célula para expresar el receptor, como una versión truncada del receptor de superficie celular, como EGFR truncado (tEGFR). En algunos aspectos, el marcador incluye todo o parte (p. ej., forma truncada) de CD34, un NGFR o receptor del factor de crecimiento epidérmico (p. ej., tEGFR). En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el marcador se une operativamente a un polinucleótido que codifica una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible, por ejemplo, T2A. Por ejemplo, un marcador, y opcionalmente una secuencia enlazadora, puede ser cualquiera de los descritos en la solicitud de patente publicada N° WO2014031687. Por ejemplo, el marcador puede ser un EGFR truncado (tEGFR) que está, opcionalmente, unido a una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible de T2A. Un polipéptido ejemplar para 45 un EGFR truncado (p. ej., tEGFR) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 111 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 111. Una secuencia conectora T2A ejemplar comprende la secuencia de aminoácidos establecidos en SEQ ID NO: 110 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia 50 con SEQ ID NO: 110.

[0106] En algunos casos, el marcador es una molécula, p. ej. Proteína de superficie celular, que no se encuentra naturalmente en la superficie de las células T, o una porción de las mismas.

[0107] En algunos casos, la molécula es una molécula no propia, p. ej., una proteína no propia, es decir, una que no es reconocida como "propia" por el sistema inmunitario del huésped al que las células se transferirán adoptivamente.

- 5 [0108] En algunos casos, el marcador no cumple ninguna función terapéutica y/o no produce ningún efecto más que para ser utilizado como marcador para la ingeniería genética, por ejemplo, para seleccionar células modificadas con éxito. En otros casos, el marcador puede ser una molécula terapéutica o molécula que ejerza de otro modo algún efecto deseado, como un ligando para que una célula se encuentre *in vivo*, como una molécula coestimuladora o de punto de control inmunitario para potenciar y/o atenuar las respuestas de las células tras la transferencia adoptiva y el encuentro con el ligando.
- 10 [0109] En algunos casos, los CAR se denominan CAR de primera, segunda y/o tercera generación. En algunos aspectos, un CAR de primera generación es aquel que únicamente proporciona una señal inducida por la cadena CD3 al unirse al antígeno; en algunos aspectos, un CAR de segunda generación es uno que proporciona tal señal y señal coestimuladora, tal como una que incluye un dominio de señalización intracelular de un receptor coestimulador tal como CD28 o CD137; en algunos aspectos, un CAR de tercera generación es uno que incluye múltiples dominios coestimuladores de diferentes receptores coestimuladores.
- 15 [0110] En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunos aspectos, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que contiene el anticuerpo o fragmento y un dominio de señalización intracelular. En algunos casos, el anticuerpo o fragmento incluye un scFv y el dominio intracelular contiene un ITAM. En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular incluye un dominio de señalización de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3 ζ). En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana que une el dominio extracelular y el dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD28. En algunos casos, el dominio transmembrana del receptor, por ejemplo, el CAR es un dominio transmembrana de CD28 humano o una variante del mismo, por ejemplo, un dominio transmembrana de 27 aminoácidos de un CD28 humano (nº de acceso: P10747,1). En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de células T. El dominio extracelular y el dominio transmembrana se pueden vincular directa o indirectamente. En algunos casos, el dominio extracelular y la transmembrana están unidos por un espaciador, como cualquiera de los descritos en este documento. En algunos casos, el receptor contiene una porción extracelular de la molécula de la que se deriva el dominio transmembrana, como una porción extracelular de CD28. En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular derivado de una molécula coestimuladora de células T o una variante funcional de la misma, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de células T es CD28 o 41BB.
- 35 [0111] Por ejemplo, en algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de CD28 o variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o variante funcional del mismo. En algunos casos, el CAR contiene un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, un dominio transmembrana que es o contiene una porción transmembrana de CD28 o una variante funcional del mismo, y un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de un 4-1BB o una variante funcional del mismo y una porción de señalización de CD3 zeta o variante funcional del mismo. En algunos de estos casos, el receptor incluye además un espaciador que contiene una porción de una molécula de Ig, como una molécula de Ig humana, como una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, como un espaciador de solo bisagra.
- 45 [0112] En algunos casos, el dominio transmembrana del receptor recombinante, por ejemplo, el CAR, es o incluye un dominio transmembrana de CD28 humano (por ejemplo, número de acceso P01747,1) o una variante del mismo, como un dominio transmembrana que comprende el secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2; en algunos casos, la porción que contiene el dominio transmembrana del receptor recombinante comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 104 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos o alrededor del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con los mismos.
- 55 [0113] En algunos casos, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de células T. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de células T es CD28 o 41BB.
- 60 [0114] En algunos casos, el (los) componente(s) de señalización intracelular del receptor recombinante, por ejemplo, el CAR, contiene un dominio de señalización intracelular coestimulador de CD28 humano o una variante funcional o una porción del mismo, como un dominio con una sustitución de LL a GG en las posiciones 186-187 de una proteína CD28 nativa. Por ejemplo, el dominio de señalización intracelular puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 112 o 113 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 112 o 113. En algunos casos, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de 4-1BB (p. ej., número de acceso Q07011,1) o variante funcional o porción del mismo, como la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

- 5 [0115] En algunos casos, el dominio de señalización intracelular del receptor recombinante, por ejemplo, el CAR, comprende un dominio de señalización estimulador de CD3 zeta humano o una variante funcional del mismo, como un dominio citoplasmático 112 AA de la isoforma 3 de humano CD3 ζ (n.^o de acceso: P20963.2) o un dominio de señalización CD3 zeta como se describe en la Patente de EE. UU. N.^o: 7,446,190 o Patente de EE. UU. N.^o 8,911,993. Por ejemplo, en algunos casos, el dominio de señalización intracelular comprende la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 4, 105 o 159 o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4, 105 o 159.
- 10 15 [0116] En algunos aspectos, el espaciador contiene solo una región bisagra de una IgG, tal como solo una bisagra de IgG4 o IgG1, tal como el espaciador solo bisagra establecido en SEQ ID NO: 1. En otros casos, el espaciador es o contiene una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra derivada de IgG4, opcionalmente unida a dominios CH2 y/o CH3. En algunos casos, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una bisagra de IgG4, unida a los dominios CH2 y CH3, tal como se establece en SEQ ID NO: 108. En algunos casos, el espaciador es una bisagra de Ig, por ejemplo, una IgG4 bisagra, unida a un dominio CH3 únicamente, tal como se establece en SEQ ID NO: 107. En algunos casos, el espaciador es o comprende una secuencia rica en glicina-serina u otro enlazador flexible como los enlazadores conocidos.
- 20 25 [0117] Por ejemplo, en algunos casos, el CAR incluye un anticuerpo como un fragmento de anticuerpo, incluidos scFv, un espaciador, como un espaciador que contiene una porción de una molécula de inmunoglobulina, como una región bisagra y/o uno o más regiones constantes de una molécula de cadena pesada, como un espaciador que contiene bisagra de Ig, un dominio transmembrana que contiene todo o una parte de un dominio transmembrana derivado de CD28, un dominio de señalización intracelular derivado de CD28 y un dominio de señalización zeta de CD3. En algunos casos, el CAR incluye: una porción de unión a ligando extracelular, como una porción de unión a antígeno, como un anticuerpo o fragmento del mismo, incluidos sdAbs y scFvs, que se une específicamente a un antígeno, por ejemplo, un antígeno descrito en este documento; un espaciador tal como cualquiera de los espaciadores que contienen bisagras Ig; un dominio transmembrana que es una porción de CD28 o una variante del mismo; un dominio de señalización intracelular que contiene una porción de señalización de 4-1BB o variante funcional del mismo; y una porción de señalización del dominio de señalización CD3 zeta o una variante funcional del mismo.
- 30 35 [0118] En algunos casos, las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas construcciones de CAR incluyen además una secuencia que codifica un elemento de salto ribosómico T2A y/o una secuencia de tEGFR, por ejemplo, cadena abajo de la secuencia que codifica CAR. En algunos casos, la secuencia codifica un elemento de salto ribosómico T2A y/o una secuencia de tEGFR expuesta en SEQ ID NO: 110 y/o 111, respectivamente, o una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO: 110 y/o 111. En algunos casos, las células T que expresan un receptor de antígeno (p. ej., CAR) también pueden generarse para expresar un EGFR truncado (EGFRt) como un epítopo de selección no inmunogénico (p. ej., mediante la introducción de una construcción que codifica CAR y EGFRt separadas por un ribosoma T2A cambia para expresar dos proteínas de la misma construcción), que luego se puede usar como un marcador para detectar tales células (ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.^o 8,802,374).
- 40 2. *Modificaciones ejemplares de un receptor químico*
- 45 [0119] En algunos casos, el receptor químico variante contiene una región de unión modificada que contiene una o más modificaciones (por ejemplo, inserciones, delecciones o reemplazos) en una región de unión de un receptor químico de referencia como se describe, en donde el receptor químico de referencia contiene un primer dominio que es o comprende un dominio de unión a ligando extracelular o una porción del mismo y un segundo dominio que es o comprende un dominio bisagra o una porción del mismo, unidos en una secuencia contigua en una unión.
- 50 55 [0120] En algunos casos, el receptor químico variante contiene una región de unión modificada que contiene una o más modificaciones (por ejemplo, inserciones, eliminaciones o reemplazos) en una región de unión de un receptor químico de referencia como se describe, en el que el receptor químico de referencia contiene un primer dominio que es o comprende un dominio bisagra o una porción del mismo y un segundo dominio que es o comprende un dominio transmembrana o una porción del mismo, unidos en secuencia contigua en una unión.
- 60 65 [0121] En algunos casos, el receptor químico variante contiene una región de unión modificada que contiene una o más modificaciones (por ejemplo, inserciones, eliminaciones o reemplazos) en una región de unión de un receptor químico de referencia como se describe, en el que el receptor químico de referencia contiene un primer dominio que es o comprende un dominio transmembrana o una porción del mismo y un segundo dominio que es o comprende un dominio de señalización coestimulador o una porción del mismo, unidos en una secuencia contigua en una unión.
- [0122] En algunos casos, el receptor químico variante contiene una región de unión modificada que contiene una o más modificaciones (por ejemplo, inserciones, eliminaciones o reemplazos) en una región de unión de un receptor químico de referencia como se describe, en el que el receptor químico de referencia contiene un primer dominio que es o comprende un dominio de señalización coestimulador o una porción del mismo y un segundo dominio que es o comprende un dominio de señalización citoplasmático activador o una porción del mismo, unidos en una secuencia contigua en una unión.

- 5 [0123] En algunos casos, el primer dominio del receptor quimérico de referencia es o comprende un dominio transmembrana o una porción del mismo. En algunos casos, el dominio transmembrana incluye los derivados de (es decir, comprende al menos la(s) región(es) transmembrana(s) de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154 y/o regiones transmembrana que contienen variantes funcionales de las mismas, como aquellas que retienen una parte sustancial de las propiedades estructurales, por ejemplo, transmembrana, propiedades de la misma. En algunos casos, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana derivado de CD4, CD28 o CD8, por ejemplo, CD8alpha, o variante funcional del mismo. En algunos casos, el dominio transmembrana se deriva de una proteína humana o es humano. En 10 algunos casos, el segundo dominio del receptor quimérico de referencia es o comprende un dominio de señalización coestimulador, que está directamente enlazado o unido al dominio transmembrana. En algunos casos, el dominio de señalización coestimulador es o comprende un dominio de señalización de CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. En algunos casos, el dominio coestimulador se deriva de una proteína humana o es humano.
- 15 10 [0124] En algunos casos, el receptor quimérico variante contiene una región de unión modificada que contiene una o más modificaciones (por ejemplo, inserciones, eliminaciones o reemplazos) en una región de unión de un receptor quimérico de referencia como se describe, en el que el receptor quimérico de referencia contiene un primer dominio que es o comprende un dominio transmembrana de CD28 o una porción del mismo y un segundo dominio que es o comprende un dominio de señalización coestimulador 4-1BB o una porción del mismo, unidos en una secuencia contigua en una unión. 20 En algunos casos, el dominio transmembrana de CD28 es o comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2, 103 o 104 o es una porción funcional o variante del mismo que comprende una secuencia que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con SEQ ID NO:2, 103 o 104. En algunos casos, el dominio de señalización 4-1BB es o comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3 o una porción funcional o variante de la misma que comprende una 25 secuencia que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:3. En algunos casos, el primer dominio y el segundo dominio juntos comprenden o tienen la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5 o una porción funcional o variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:5. En algunos casos, el 30 primer dominio y el segundo dominio del receptor quimérico de referencia juntos tienen o comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:5.
- 35 [0125] En algunos casos, la variante del receptor quimérico comprende una región de unión modificada que es menos del 100 % idéntica en secuencia a SEQ ID NO: 137 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % idéntico a SEQ ID NO: 137 e incluye la(s) modificación(es), como cualquiera de las descritas. En algunos casos, el receptor quimérico variante tiene o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia inferior al 100 % con la SEQ ID NO: 5 pero superior al 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % idéntico a SEQ ID NO:5 e incluye la(s) modificación(es), como cualquiera de las descritas. En algunos casos, la variante del receptor quimérico tiene o comprende una secuencia de aminoácidos que es menos del 40 100 % idéntica en secuencia a la SEQ ID NO: 160 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % idéntico a SEQ ID NO:160 e incluye la(s) modificación(es), como cualquiera de las descritas. En algunos casos, la variante del receptor quimérico tiene o comprende una región de unión modificada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 138-157 y 184, una variante funcional del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos que exhibe al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ 45 ID NOS: 138-157 y 184.
- 50 [0126] En algunos casos, la variante del receptor quimérico no contiene una modificación en o de un residuo de aminoácido hidrofóbico o dentro de una porción hidrofóbica en el dominio transmembrana, tal como el dominio transmembrana CD28. En algunos casos, la variante del receptor quimérico contiene una o más modificaciones en o de residuos de aminoácidos hidrofóbicos o dentro de una porción hidrofóbica en el dominio transmembrana, tal como el dominio transmembrana CD28. En algunos casos, la una o más modificaciones es o comprende una sustitución del aminoácido hidrofóbico con otro residuo de aminoácido hidrofóbico diferente. En algunos casos, una o más modificaciones no son o no comprenden una modificación en o de un residuo de aminoácido hidrofóbico o dentro de una porción hidrofóbica en el dominio transmembrana que no sea una sustitución con otro residuo de aminoácido hidrofóbico. 55
- 60 [0127] En algunos casos, los dominios transmembrana contienen uno o más residuos de triptófano que interactúan con las bicapas lipídicas de una membrana. En algunos casos, uno o más residuos de triptófano pueden ubicarse cerca de la interfase lípido-agua. En algunos casos, uno o más residuos de triptófano anclan o ayudan a anclar el dominio transmembrana dentro de la membrana. Véase, por ejemplo, de Jesús y Allen, *Biochim Biophys Acta*. 2013 febrero; 1828(2):864-76. En algunos casos, la variante del receptor quimérico no contiene una modificación en uno o ambos residuos de triptófano en el dominio transmembrana, como el dominio transmembrana CD28. En algunos casos, el receptor quimérico no contiene una modificación en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 2 y/o la posición 26 con referencia a la numeración de SEQ ID NO: 5, cada una de las cuales corresponde a un triptófano en el receptor quimérico de referencia. 65

- [0128]** En algunos aspectos, se evalúa el carácter hidrófobo de un receptor químérico, o una parte del mismo. En algunos casos, se usan programas tales como gran promedio de hidropatía (GRAVY) para evaluar la hidrofobicidad global del receptor químérico (por ejemplo, receptor químérico variante), o una parte del mismo. En algunos casos, se utilizan programas como los disponibles a través de ExPASy (Suiza) para determinar la puntuación de hidrofobicidad global para un receptor químérico, o parte del mismo. En algunos aspectos, el receptor químérico comprende un dominio transmembrana, que puede tener una puntuación de hidrofobicidad que indica que el carácter global de este dominio es hidrofóbico. En algunos aspectos, el receptor químérico comprende uno o más dominios distintos de un dominio transmembrana, que pueden tener puntuaciones de hidrofobicidad que indican que uno o más dominios son globalmente hidrofílicos. En algunos aspectos, la hidrofobicidad para cada residuo de aminoácido individual de una secuencia de proteína dada (por ejemplo, receptor químérico o porción del mismo) se calcula en base a una escala de hidrofobicidad. Las escalas de hidrofobicidad de aminoácidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a aquellas calculadas y/o reportadas por Kyte y Doolittle (1982), Engelman et al. (1986), Nozaki y Tanford (1971), Miyazawa y Jernigan (1996), Miyazawa y Jernigan (1999) y Black and Mold (1991). En algunos casos, las escalas de hidrofobicidad se notifican o normalizan de modo que a los residuos hidrofílicos o péptidos se les otorga una puntuación inferior a 0 y a los residuos hidrofóbicos o péptidos se les otorga una puntuación superior a 0. Por lo tanto, en algunos aspectos, un dominio transmembrana puede tener una puntuación de hidrofobicidad global superior a 0, o puede estar compuesta por residuos individuales con puntuaciones de hidrofobicidad superiores a 0. En algunos casos, las mutaciones o modificaciones en un residuo, péptido, receptor químérico o parte del mismo, son conservativas con respecto a la hidrofobicidad del residuo o péptido sin modificar puntaje.
- [0129]** En algunos casos, el receptor químérico variante o una porción del mismo, por ejemplo, una porción que contiene la región de unión modificada y/o que contiene un dominio en el receptor químérico variante que corresponde al dominio transmembrana del receptor químérico de referencia, tiene un perfil de hidropatía hidrofóbica y/o tiene un gran promedio positivo de valor de hidropatía (GRAVY). En algunos casos, el valor de GRAVY es superior a 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2 o superior.
- [0130]** En algunos casos, la variante del receptor químérico no contiene una modificación en o de un residuo de aminoácido implicado o necesario para la señalización del dominio de señalización coestimulador, tal como en o de un residuo de aminoácido implicado en o necesario para Señalización 4-1BB. En general, la señalización coestimuladora implica interacciones con moléculas TRAF. En algunos casos, la variante del receptor químérico no contiene una modificación en o de un residuo de aminoácido que interactúa con o es parte de un motivo de unión para unirse a una molécula TRAF. En algunos casos, la variante del receptor químérico no contiene una modificación en o de un residuo de aminoácido en el dominio de señalización coestimulador del receptor químérico de referencia que comprende el motivo (P/S/A/T)(Q/E)E. En algunos casos, la molécula TRAF es TRAF 1, TRAF2 y/o TRAF3. En algunos casos, el dominio en el receptor químérico variante que corresponde al dominio de señalización coestimulador del receptor químérico de referencia es capaz de inducir la activación o localización celular de un TRAF y/o es capaz de inducir la señalización mediada por TRAF. En algunos casos, el receptor químérico variante contiene aminoácidos TTQE en las posiciones correspondientes a 49-52 y/o aminoácidos PEEE en las posiciones correspondientes a los residuos 60-63, cada uno con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5.
- [0131]** En algunos casos, la variante del receptor químérico contiene una o más modificaciones de aminoácidos dentro de una porción entre los residuos 13 y 42 o entre los residuos de aminoácidos 15 y 40, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5.
- [0132]** En algunos casos, la modificación es o incluye la inserción de uno o más residuos de aminoácidos. En algunos casos, la una o más inserciones se encuentran entre residuos de aminoácidos adyacentes a la unión entre los dominios. En algunos casos, la una o más inserciones de aminoácidos se encuentran entre los residuos de aminoácidos 27 y 28 con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5. En algunos casos, la una o más inserciones pueden incluir la inserción de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos de aminoácidos. En algunos casos, la inserción es de 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos. En algunos casos, la inserción es para cualquier residuo de aminoácido. En algunos casos, la inserción de es la inserción de una asparagina (N).
- [0133]** En algunos casos, la modificación es o incluye uno o más reemplazos de aminoácidos en un resto correspondiente al resto 28, 31 o 34 con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5. En algunos casos, la sustitución del aminoácido puede ser por cualquier otro aminoácido. En algunos casos, el reemplazo de aminoácido es a un residuo de aminoácido que es leucina (L), asparagina (N), glutamina (Q), alanina (A), serina (S) o histidina (H). En algunos casos, el reemplazo de aminoácido es o corresponde a uno o más de K28A, K28H, K28L, K28Q, K28S, K28R, R31A, R31H, R31L, R31N, R31S, L34A y L34S, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5.
- [0134]** En algunos casos, la variante del receptor químérico contiene una región de unión modificada con dos o más, como hasta 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más modificaciones de aminoácidos en comparación con una región de unión de un receptor químérico de referencia. En algunos casos, la modificación de aminoácidos incluye reemplazos de aminoácidos correspondientes a dos o más de K28A, K28H, K28L, K28Q, K28S, R31A, R31H, R31L, R31N, R31S, L34A y L34S, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO: 5. En algunos casos, los reemplazos de aminoácidos son o corresponden a reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K28Q/R31A, K28Q/R31N, K28Q/R31S, K28Q/L34A, K28Q/L34S, R31N/L34A, R31N/L34S, K28Q/R31N/ L34A, K28Q/R31N/L34S.

5 [0135] En algunos casos, el receptor quimérico variante tiene o comprende una región de unión modificada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NOS: 138-157 y 184, o una variante funcional del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos ácidos que exhiben al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 138-157 y 184 cada uno que incluye la(s) modificación(es).

10 [0136] En algunos casos, la variante del receptor quimérico tiene o comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 114-134 y 183, una variante funcional del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 114-134 y 183 cada uno que incluye la(s) modificación(es).

15 3. *Características de los receptores quiméricos variantes*

20 [0137] En algunos casos, el receptor quimérico variante contiene una región de unión modificada de modo que los fragmentos peptídicos de dicha región o derivados de dicha región exhiben una menor afinidad de unión por un antígeno leucocitario humano (HLA) y/o la región muestra inmunogenicidad reducida, incluso después de la administración a un sujeto.

25 [0138] En algunos casos, un fragmento de péptido que tiene la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión modificada tiene una afinidad de unión por una molécula de antígeno leucocitario humano (HLA) que es menor que la afinidad de unión, por la misma molécula HLA, de un fragmento peptídico que tiene la secuencia de la porción correspondiente de la región de unión del receptor quimérico de referencia. En algunos casos, el fragmento peptídico de la porción correspondiente de la región de unión del receptor quimérico de referencia tiene una afinidad de unión inferior a 1000 nM, inferior a 500 nM o inferior a 50 nM.

30 [0139] En algunos casos, el promedio de las afinidades de unión de todos los fragmentos de 8-15 aminoácidos, o de todos los fragmentos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos, dentro de la región de unión modificada para una molécula HLA humana es menor que el promedio de las afinidades de unión de los 8-15 fragmentos de aminoácidos, o de los 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 fragmentos de aminoácidos, dentro de la región de unión del receptor quimérico de referencia. En algunos casos, la afinidad de unión o el promedio de afinidades de unión es más de 2 veces, más de 5 veces, más de 10 veces, más de 25 veces, más de 50 veces o más de 100 veces menor.

35 [0140] En algunos casos, el número de fragmentos peptídicos que tienen la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión modificada que tiene una afinidad de unión por un antígeno leucocitario humano (HLA) de menos de 1000 nM se reduce en comparación con el número de fragmentos peptídicos que tienen la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión del receptor quimérico de referencia que tiene la misma afinidad por unirse al mismo HLA. En algunos casos, el número de fragmentos peptídicos que tienen la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión modificada que tiene una afinidad de unión por un antígeno leucocitario humano (HLA) de menos de 500 nM se reduce en comparación con el número de fragmentos peptídicos que tienen la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión del receptor quimérico de referencia que tiene la misma afinidad por unirse al mismo HLA. En algunos casos, el número de fragmentos peptídicos que tienen la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión modificada que tiene una afinidad de unión por un antígeno leucocitario humano (HLA) de menos de 50 nM se reduce en comparación con el número de fragmentos peptídicos que tienen la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión del receptor quimérico de referencia que tiene la misma afinidad por unirse al mismo HLA.

50 [0141] En algunos casos, la afinidad de unión puede determinarse experimental o algorítmicamente. En algunos casos, la afinidad de unión de un péptido por un MHC puede determinarse computacionalmente, como usando algoritmos basados en modelos de afinidad de unión cuantitativa (Lafuente y Reche (2009) Current Pharmaceutical Design, 15:3209-3220). En algunos casos, la afinidad de unión se puede determinar en un ensayo *in vitro*.

55 [0142] En algunos casos, la determinación de la afinidad de unión de un péptido a una molécula de MHC implica ensayos de unión de competición de radiactividad o fluorescencia. Véase, por ejemplo, Ettlinger y col., J. Immunol. 160:2365 (1998). En algunos casos, el ensayo de competencia produce una comparación de las afinidades de unión de diferentes péptidos. Algunos estudios de unión al MHC utilizan moléculas de clase I solubilizadas con detergente de líneas celulares transformadas con EBV (ver, por ejemplo, Sette, A., et al., Mol Immunol, 31(11):813-22 (1994)). En algunos casos, el ensayo competitivo involucra MHC cargado naturalmente, y la molécula de MHC de interés puede purificarse de otras moléculas de MHC en el lisado de detergente o usarse en una mezcla con otras moléculas de MHC. En algunos casos, se pueden identificar péptidos radiomarcados que tienen una alta afinidad por la molécula de MHC en cuestión. En algunos casos, la afinidad de péptidos de "prueba" adicionales por la molécula de MHC en cuestión se determina luego por su capacidad para competir con el péptido radiomarcado de alta afinidad.

65 [0143] En algunos casos, la determinación de la afinidad de péptido puede implicar un ensayo de reconstitución, por ejemplo, utilizando células "T2", en el que las células que expresan un alelo MHC apropiado se "despojan" de un péptido

- de unión nativo mediante la incubación a pH 2-3 durante un período corto de tiempo. En algunos casos, para determinar la unión de afinidad de un péptido de unión a MHC putativo por el mismo alelo de MHC, el monómero de MHC despojado se puede combinar en solución con el péptido de unión a MHC putativo, beta2-microglobulina y un anticuerpo monoclonal dependiente de la conformación. En algunos casos, la diferencia en la intensidad de la fluorescencia determinada entre 5 las células incubadas con y sin el péptido de unión de la prueba después del etiquetado, por ejemplo, ya sea directamente con el anticuerpo monoclonal marcado o un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, se puede usar para determinar la unión del péptido de la prueba.
- [0144] En algunos casos, la afinidad de unión por una molécula de MHC (p. ej., HLA) está representada por una CI50, 10 que es la concentración de péptido en un ensayo de unión en el que se observa una inhibición del 50 % de la unión de un péptido de referencia. En algunos casos, dichos ensayos se pueden realizar en condiciones en las que los valores de CI50 se aproximan a los valores de KD (es decir, limitando las concentraciones de proteínas HLA y péptidos marcados). En algunos casos, la unión se puede expresar en relación con un péptido de referencia.
- [0145] En algunos casos, la afinidad de unión se puede predecir usando métodos in silico. Se conocen en la técnica 15 métodos ejemplares in silico para predecir la afinidad de unión para la unión del MHC utilizando métodos algorítmicos u otros métodos computacionales. Véase, por ejemplo, Marsh, et al., *The HLA Factsbook* (Academic Press, 2000). En algunos casos, se puede usar un algoritmo para predecir si un péptido de interés debe unirse a una molécula MHC determinada. Véase, por ejemplo, Southwood y col., *J. Immunol.* 160:3363 (1998); Honeyman y col., *Nat. Biotechnol.* 20 16:966-969 (1998); Breisie, et al., *Bioinformatics* 14:121-131 (1998), así como el algoritmo "SYFPEITHI" (Hans-Georg Rammensee, et al., *Immunogenetics* (1999) 50: 213-219), Zhang et al., *PLoS ONE* 7(2): e30483. doi: 10.1371/journal.pone.0030483, el recurso de análisis y epítopo inmunológico (IEDB) (Peters B, et al. *PLoS Biology* 3: 379 (2005)), y el algoritmo "BIMAS" (Parker, KC, MA Bednarek, y JE Coligan. *J. Immunol.* 152:163 (1994)).
- [0146] En algunos casos, las herramientas de predicción de algoritmos, incluidas las disponibles de IEDB, usan una o más predicciones usando ANN (Nielsen et al. (2003) *Protein Sci.*, 12:1007-1017 y Lundgaard et al. (2008) *NAR*, 36:W509-512), SMM (Peters and Sette (2005) *BMC Bioinformatics*, 6:132) y comblib (Sidney et al. (2008) *Immunome Res.* 4:2), o la herramienta de consenso (ver Kim, et al. (2012) recurso de análisis de base de datos de epítopos inmunes, NAR, que combina predicciones de cualquiera de los anteriores). 25
- [0147] En algunos casos, la predicción del procesamiento de antígenos puede ser logrado utilizando un algoritmo para la escisión proteasomal (PaProC). Véase Kuttler et al., *J. Mol. Biol.* 298 (2000), 417-429 y Nussbaum et al., *Immunogenetics* 53 (2001), 87-94.
- [0148] En algunos casos, un receptor quimérico (p. ej., un CAR), que incluye una variante del receptor quimérico (p. ej., una variante de CAR) puede evaluarse para determinar si se induce una respuesta inmunitaria detectable a la molécula 30 después de la administración a un sujeto. En algunos casos, un sujeto puede tratarse con un receptor quimérico, como un CAR, por ejemplo, mediante la administración de células modificadas genéticamente con el receptor quimérico o CAR. Puede evaluarse la presencia de una respuesta humana humoral o mediada por células. En algunos casos, la presencia de anticuerpos que se unen específicamente y/o neutralizan los epítopos de unión del receptor quimérico (p. ej., CAR) puede identificarse mediante métodos como ELISpot, tinción de citocinas intracelulares, ELISA (p. ej., para citocinas) o métodos de detección de anticuerpos basados en células, por ejemplo, por citometría de flujo, en suero del sujeto. En 35 algunos casos, se puede evaluar una respuesta inmunitaria mediada por células al receptor quimérico, como un receptor quimérico expresado en células modificadas genéticamente, mediante un ensayo de linfocitos T citotóxicos (CTL) para la detección de células T CD8⁺ que se unen específicamente e inducen citotoxicidad y/o una reacción mixta de linfocitos, usando células, por ejemplo, células irradiadas, que expresan el receptor quimérico, como células estimuladoras.
- [0149] En algunos casos, se puede evaluar una respuesta inmunitaria en un ensayo *in vitro* mediante la estimulación de 40 células inmunitarias aisladas (p. ej., PBMC) de un sujeto al que se le administró un receptor quimérico (p. ej., CAR) con una biblioteca sintética de péptidos que se superponen y abarcan la longitud del antígeno particular. La respuesta inmunitaria en células estimuladas se puede evaluar mediante métodos que incluyen, entre otros, ELISpot, tinción de citoquinas intracelulares, ensayos de linfocitos T citotóxicos y/o reacciones mixtas de linfocitos. En algunos casos, la activación de las células T se mide a través de la proliferación de células T (por ejemplo, utilizando la incorporación de 3H-timidina) o la producción de citoquinas. La activación de células T CD4⁺ de tipo TH1 puede, por ejemplo, detectarse a 45 través de la producción de IFNy que puede detectarse mediante técnicas estándar, como un ensayo ELISPOT.
- [0150] En algunos casos, se puede emplear un ensayo de inmunospot ligado a enzimas (ELISpot) para evaluar una respuesta inmunitaria a un receptor quimérico. En algunos aspectos, un ELISpot puede adaptarse para la detección de 50 células individuales que secretan citocinas específicas u otras moléculas efectoras mediante la unión de un anticuerpo monoclonal específico para una citocina o molécula efectora en una microplaca. Las células estimuladas por un antígeno pueden ponerse en contacto con el anticuerpo inmovilizado. Después de lavar las células y cualquier sustancia no unida, se puede agregar a los pocillos un anticuerpo políclonal marcado o, más a menudo, un anticuerpo monoclonal, específico para la misma citocina u otra molécula efectora. Después de un lavado, se puede agregar un colorante que se une al anticuerpo marcado de manera que se forme un precipitado (o mancha) de color negro azulado en los sitios de localización 55 de las citocinas. Los puntos se pueden contar manualmente o con el sistema de lectura ELISpot automatizado para cuantificar la respuesta.

- 5 [0151] En algunos casos, la actividad citotóxica mediada por células T CD8⁺ puede emplearse para evaluar una respuesta inmunitaria al receptor químérico. En algunos casos, las células estimuladas con un antígeno (p. ej., esplenocitos) pueden analizarse mediante un ensayo de liberación de cromo para detectar citotoxicidad frente a células marcadas con 51Cr. Este ensayo puede medir la liberación de cromo radiactivo (biológico) de las células como resultado de la actividad de las células asesinas. Las células se pueden volver a estimular con un antígeno *in vitro*, por ejemplo, células modificadas genéticamente con un receptor químérico (p. ej., células que expresan CAR), incluidas células T, células T cargadas con péptidos y/o células T no transducidas ("simuladas") (objetivos) en varias proporciones efector-objetivo (E/T). Después de la coincubación, se puede cuantificar la liberación de cromo y determinar el porcentaje de lisis máxima alcanzable en cada muestra. Las condiciones en las que no se detecta actividad citolítica específica indican que no se desarrolló una respuesta inmunitaria específica al receptor químérico después de la administración conjunta con el péptido tolerogénico. Este resultado puede indicar un éxito potencial para la administración de un péptido específico en condiciones capaces de inducir tolerancia inmunogénica al receptor químérico.
- 10 [0152] En algunos casos, la tinción de citoquinas intracelulares se emplea para evaluar una respuesta inmune al receptor químérico, tal como en presencia o ausencia de coadministración con el péptido tolerogénico. Las células inmunitarias, como los esplenocitos, pueden aislarse de los ratones y teñirse con anticuerpos para detectar la expresión superficial de CD8 y CD4 y la expresión intracelular de citoquinas, incluyendo, por ejemplo, IFNy. Las condiciones en las que la tinción de citoquinas intracelulares indica que las células T no generaron una respuesta inmunitaria específica al receptor químérico pueden indicar un éxito potencial para la administración de un péptido específico en condiciones capaces de inducir tolerancia inmunogénica al receptor químérico.
- 15 [0153] En algunos casos, se emplea la secuenciación clonal para evaluar una respuesta inmunitaria al receptor químérico. Pueden secuenciarse los receptores de células T de células T aisladas de ratones o pacientes expuestos (ver Arstila et al. (1999) *Science* 286, 958-961; WO 2012/083069). La ausencia de expansión clonal de TCR indica que las células T no generaron una respuesta inmune al receptor químérico. Esto puede indicar un éxito potencial para la administración de un péptido específico en condiciones capaces de inducir tolerancia inmunogénica al receptor químérico.
- 20 [0154] En algunos casos, el receptor químérico variante muestra una respuesta inmunitaria detectable reducida en comparación con la respuesta inmunitaria generada al receptor químérico de referencia. En algunos casos, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humorada. En algunos casos, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por células. En algunos casos, la respuesta inmunitaria se reduce más de 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces o más.
- 25 [0155] En algunos casos, el receptor químérico variante muestra inmunogenicidad reducida en comparación con el receptor químérico de referencia (por ejemplo, receptor químérico original o no modificado) tras la administración a un sujeto humano, opcionalmente en el que el sujeto ha recibido la administración del receptor químérico de referencia. En algunos casos, la inmunogenicidad reducida comprende una respuesta inmunitaria de células T CD8⁺ reducida y/o una respuesta inmunitaria de células T CD4⁺ reducida. En algunos casos, la inmunogenicidad se reduce más de 1,2 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces -veces, 50 veces, 100 veces o más.
- 30 [0156] En algunos casos, el número máximo de células que expresan el receptor químérico variante (por ejemplo, CAR), el área bajo la curva (AUC) para las células que expresan el receptor químérico variante a lo largo del tiempo, y/o la duración de células de expresión del receptor químérico variante detectable en el sujeto después de la administración de células que expresan el receptor químérico variante es mayor en comparación con la que se logra a través de un método que comprende la administración de células que expresan el receptor químérico de referencia. En algunos casos, el método da como resultado una concentración o número máximo de células que expresan el receptor químérico variante en la sangre del sujeto de al menos 10 células que expresan químérico por microlitro, al menos el 50 % del número total de células mononucleares sanguíneas (PBMC), al menos aproximadamente 1 x 10⁵ células que expresan receptores químéricos, o al menos 1000, o al menos 2000, o al menos 3000, o al menos 4000, o al menos 5000 copias de células que codifican CAR ADN por microgramos de ADN. En algunos casos, el día 30, el día 60 o el día 90 después del inicio de la administración de células que expresan el receptor químérico variante, las células que expresan el receptor químérico variante son detectables en la sangre o el suero del sujeto.
- 35 [0157] En algunos casos, la variante del receptor químérico exhibe una inmunogenicidad reducida como se describe, al mismo tiempo que retiene la actividad o función biológica, como la actividad citotóxica, en comparación con el receptor químérico de referencia (receptor químérico original o no modificado que no contiene el reemplazo de aminoácido). En algunos casos, la actividad biológica, como la actividad citotóxica, está presente de forma específica para el antígeno. En algunos casos, la actividad biológica o funcional, como la actividad citotóxica, del receptor químérico variante es de al menos 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, como por lo general al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % de la actividad biológica o actividad funcional (p. ej., actividad citotóxica) del receptor químérico original o no modificado que no contiene el(s) reemplazo(s) de aminoácido.
- 40 [0158] En algunos casos, la actividad biológica o la actividad funcional de un receptor químérico, tal como la actividad citotóxica, puede medirse usando cualquiera de varios métodos conocidos. La actividad se puede evaluar o determinar in

vitro o in vivo. En algunos casos, la actividad puede evaluarse una vez que las células se administran al sujeto (p. ej., humano). Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de un linfocito T modificado o natural u otra célula inmunitaria al antígeno, por ejemplo, in vivo, por ejemplo, mediante formación de imágenes, o ex vivo, por ejemplo, mediante ELISA o citometría de flujo. En ciertos casos, la capacidad de las células modificadas para destruir las células diana se puede medir utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, como los ensayos de citotoxicidad descritos, por ejemplo, en Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009) y Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). En ciertos casos, la actividad biológica de las células también se puede medir analizando la expresión y/o secreción de ciertas citocinas, como CD 107a, IFN γ , IL-2 y TNF. En algunos aspectos, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, como la reducción de la carga o carga tumoral.

10 III. Ácidos nucleicos, vectores y células manipuladas

[0159] Se describen métodos, ácidos nucleicos, composiciones y kits para producir células modificadas genéticamente. La ingeniería genética generalmente implica la introducción de un ácido nucleico que codifica el receptor quimérico en una composición que contiene las células cultivadas, como por transducción, transfección o transformación retroviral.

[0160] En algunos casos, la molécula de ácido nucleico codifica los receptores recombinantes, por ejemplo, el receptor quimérico, como cualquiera de los descritos anteriormente. También se describen vectores o construcciones que contienen dichas moléculas de ácido nucleico. En algunos casos, los vectores o construcciones contienen uno o más 20 promotores unidos operativamente al nucleótido que codifica el receptor para impulsar la expresión del mismo. En algunos casos, el promotor se une operativamente a una o más de una molécula de ácido nucleico.

[0161] En algunos casos, el vector o construcción puede contener un solo promotor que dirige la expresión de una o más 25 moléculas de ácido nucleico. En algunos casos, dichos promotores pueden ser multicistrónicos (bicistrónicos o tricistrónicos, véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. n° 6.060.273). Por ejemplo, en algunos casos, las unidades de transcripción se pueden diseñar como una unidad bicistrónica que contiene un IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), que permite la coexpresión de productos génicos (p. ej., que codifica un primer y segundo receptor quimérico) mediante 30 un mensaje de un solo promotor. Alternativamente, en algunos casos, un solo promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contiene, en un solo marco de lectura abierto (ORF), dos o tres genes (p. ej., que codifican un primer y segundo receptor quimérico) separados entre sí por secuencias que codifican un péptido de autoescisión (p. ej., T2A) o un sitio de reconocimiento de proteasa (p. ej., furina). Por lo tanto, el ORF codifica una sola poliproteína que, ya sea durante (en el caso de T2A) o después de la traducción, se escinde en las proteínas individuales. En algunos casos, el péptido, como T2A, puede hacer que el ribosoma salte (omita el ribosoma) la síntesis de un enlace peptídico en el extremo C-terminal 35 de un elemento 2A, lo que lleva a la separación entre el final de la secuencia 2A y el siguiente péptido corriente abajo. Los ejemplos de péptidos de escisión 2A, incluidos los que pueden inducir la omisión de ribosomas, son T2A, P2A, E2A y F2A.

[0162] También se describen células tales como células que contienen un receptor quimérico manipulado, tal como se describe en el presente documento. También se describen poblaciones de tales células, composiciones que contienen 40 tales células y/o enriquecidas para tales células, tales como en las que las células que expresan el receptor quimérico constituyen al menos 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o más por ciento del total de células en la composición o células de cierto tipo tales como células T o células CD8 $^{+}$ o CD4 $^{+}$. Entre las composiciones se encuentran composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración, como para terapia celular adoptiva. También se describen métodos terapéuticos para administrar las células y composiciones a sujetos, por ejemplo, pacientes.

[0163] Por lo tanto, también se describen células manipuladas genéticamente que expresan los receptores quiméricos, por ejemplo, células que contienen los CAR. Las células generalmente son células eucarióticas, tales como células de mamíferos, y normalmente son células humanas. En algunos casos, las células se derivan de la sangre, la médula ósea, la linfa o los órganos linfoides, son células del sistema inmunitario, como células de la inmunidad innata o adaptativa, por ejemplo, células mieloides o linfoides, incluidos los linfocitos, típicamente células T y/o células NK. Otros ejemplos de células incluyen células madre, tales como células madre multipotentes y pluripotentes, incluidas células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las células suelen ser células primarias, como las que se aíslan directamente de un sujeto y/o se aíslan de un sujeto y se congelan. En algunos casos, las células incluyen uno o más subconjuntos de células T u otros tipos de células, como poblaciones de células T completas, células CD4 $^{+}$, células CD8 $^{+}$ y subpoblaciones de las 55 mismas, como las definidas por función, estado de activación, madurez, potencial para capacidades de diferenciación, expansión, recirculación, localización y/o persistencia, especificidad de antígeno, tipo de receptor de antígeno, presencia en un órgano o compartimento particular, marcador o perfil de secreción de citoquinas y/o grado de diferenciación. Con referencia al sujeto a tratar, las células pueden ser alogénicas y/o autólogas. Entre los métodos se incluyen métodos listos para usar. En algunos aspectos, como en el caso de las tecnologías estándar, las células son pluripotentes y/o 60 multipotentes, como las células madre, como las células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En algunos casos, los métodos incluyen aislar células del sujeto, prepararlas, procesarlas, cultivarlas y/o diseñarlas, como se describe en este documento, y reintroducirlas en el mismo paciente, antes o después de la crioconservación.

[0164] Entre los subtipos y subpoblaciones de células T y/o de células T CD4 $^{+}$ y/o de células T CD8 $^{+}$ se encuentran las 65 células T ingenuas (T_N), células T efectoras (T_{EFF}), células T de memoria y subtipos de las mismas, tales como células madre T de memoria (T_{SCM}), T de memoria central (T_{CM}), T de memoria efectora (T_{EM}) o células T de memoria efectoras

diferenciadas terminalmente, linfocitos infiltrantes de tumores (LIT), células T inmaduras, células T maduras, células T colaboradoras, células T citotóxicas, células T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT), células T reguladoras (Treg) naturales y adaptativas, células T colaboradoras, como células TH1, células TH₂, células TH₃, células TH17, células TH9, células TH₂₂, linfocitos T colaboradores foliculares, linfocitos T alfa/beta y linfocitos T delta/gamma.

5

[0165] En algunos casos, las células son células asesinas naturales (NK). En algunos casos, las células son monocitos o granulocitos, por ejemplo, células mieloides, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y/o basófilos.

10

[0166] En algunos casos, las células incluyen uno o más ácidos nucleicos introducidos mediante ingeniería genética y, por lo tanto, expresan productos recombinantes o modificados genéticamente de dichos ácidos nucleicos. En algunos casos, los ácidos nucleicos son heterólogos, es decir, normalmente no están presentes en una célula o muestra obtenida de la célula, como la obtenida de otro organismo o célula, que, por ejemplo, normalmente no se encuentra en la célula que se está manipulando y/o un organismo del que se deriva dicha célula. En algunos casos, los ácidos nucleicos no son naturales, como un ácido nucleico que no se encuentra en la naturaleza, incluido uno que comprende combinaciones químicas de ácidos nucleicos que codifican varios dominios de múltiples tipos de células diferentes.

15

Preparación de células para ingeniería

20

[0167] En algunos casos, la preparación de células modificadas incluye una o más etapas de cultivo y/o preparación. Las células para la introducción del receptor químico, por ejemplo, CAR, pueden aislarse de una muestra, como una muestra biológica, por ejemplo, una obtenida o derivada de un sujeto. En algunos casos, el sujeto del que se aísla la célula es uno que padece la enfermedad o afección o que necesita una terapia celular o al que se le administrará la terapia celular. En algunos casos, el sujeto es un ser humano que necesita una intervención terapéutica particular, como la terapia celular adoptiva para la que se aíslan, procesan y/o manipulan células.

25

[0168] En consecuencia, las células en algunos casos son células primarias, por ejemplo, células humanas primarias. Las muestras incluyen tejidos, fluidos y otras muestras tomadas directamente del sujeto, así como muestras resultantes de uno o más pasos de procesamiento, como separación, centrifugación, ingeniería genética (por ejemplo, transducción con vector viral), lavado y/o incubación. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra procesada. Las muestras biológicas incluyen, entre otros, fluidos corporales, como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos, incluidas las muestras procesadas derivadas de los mismos.

30

[0169] En algunos aspectos, la muestra de la que se derivan o aíslan las células es sangre o una muestra derivada de sangre, o es o se deriva de un producto de aféresis o leuocitosis. Ejemplos de muestras incluyen sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglio linfático, tejido linfoide asociado al intestino, tejido linfoide asociado a la mucosa, bazo, otros tejidos linfoideos, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello uterino, testículos, ovarios, amígdala u otro órgano y/o células derivadas de los mismos. Las muestras incluyen, en el contexto de la terapia celular, por ejemplo, terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogénicas.

40

[0170] En algunos casos, las células se derivan de líneas celulares, por ejemplo, líneas de células T. Las células en algunos casos se obtienen de una fuente xenogénica, por ejemplo, de ratón, rata, primate no humano o cerdo.

45

[0171] En algunos casos, el aislamiento de las células incluye una o más etapas de preparación y/o separación de células basadas en la no afinidad. En algunos ejemplos, las células se lavan, centrifugan y/o incuban en presencia de uno o más reactivos, por ejemplo, para eliminar componentes no deseados, enriquecer los componentes deseados, lisar o eliminar células sensibles a reactivos particulares. En algunos ejemplos, las células se separan en función de una o más propiedades, como densidad, propiedades adherentes, tamaño, sensibilidad y/o resistencia a componentes particulares.

50

[0172] En algunos ejemplos, las células de la sangre circulante de un sujeto se obtienen, por ejemplo, por aféresis o leuocitosis. Las muestras, en algunos aspectos, contienen linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas, y en algunos aspectos contienen células distintas de glóbulos rojos y plaquetas.

55

[0173] En algunos casos, las células sanguíneas recogidas del sujeto se lavan, por ejemplo, para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para las etapas de procesamiento posteriores. En algunos casos, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunos casos, la solución de lavado carece de calcio y/o magnesio y/o muchos o todos los cationes divalentes. En algunos aspectos, se realiza un paso de lavado en una centrifugadora de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, Baxter) según las instrucciones del fabricante. En algunos aspectos, se logra un paso de lavado mediante filtración de flujo tangencial (TFF) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos, las células se resuspenden en una variedad de tampones biocompatibles después del lavado, como, por ejemplo, PBS libre de Ca⁺⁺/Mg⁺⁺. En ciertos casos, los componentes de una muestra de células sanguíneas se eliminan y las células se resuspenden directamente en medios de cultivo.

5 [0174] En algunos casos, los métodos incluyen métodos de separación de células basados en la densidad, como la preparación de glóbulos blancos a partir de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y la centrifugación a través de un gradiente de Percoll o Ficoll.

10 [0175] En algunos casos, los métodos de aislamiento incluyen la separación de diferentes tipos de células en función de la expresión o presencia en la célula de una o más moléculas específicas, como marcadores de superficie, por ejemplo, proteínas de superficie, marcadores intracelulares o ácido nucleico. En algunos casos, puede usarse cualquier método conocido para la separación basado en dichos marcadores. En algunos casos, la separación es una separación basada en afinidad o inmunofinididad. Por ejemplo, el aislamiento en algunos aspectos incluye la separación de células y poblaciones celulares en función de la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, normalmente marcadores de superficie celular, por ejemplo, mediante incubación con un anticuerpo o pareja de unión que se une específicamente a dichos marcadores, seguidos generalmente por etapas de lavado y separación de las células que se han unido al anticuerpo o pareja de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o pareja de unión.

15 [0176] Dichos pasos de separación pueden basarse en la selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos se conservan para su uso posterior, y/o la selección negativa, en la que se conservan las células que no se han unido al anticuerpo o pareja de unión. En algunos ejemplos, ambas fracciones se conservan para su uso posterior. En algunos aspectos, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no hay ningún anticuerpo disponible que identifique específicamente un tipo de célula en una población heterogénea, de modo que la separación se realice mejor en función de marcadores expresados por células distintas de la población deseada.

20 [0177] La separación no necesita dar como resultado un enriquecimiento o eliminación del 100 % de una población celular particular o células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento de células de un tipo particular, como las que expresan un marcador, se refiere al aumento del número o porcentaje de dichas células, pero no necesariamente da como resultado una ausencia total de células que no expresan el marcador. Asimismo, la selección negativa, la eliminación o el agotamiento de células de un tipo particular, como las que expresan un marcador, se refiere a la disminución del número o porcentaje de tales células, pero no tiene por qué dar como resultado una eliminación completa de todas esas células.

25 [0178] En algunos ejemplos, se llevan a cabo múltiples rondas de pasos de separación, donde la fracción seleccionada positiva o negativamente de un paso se somete a otro paso de separación, como una selección positiva o negativa posterior. En algunos ejemplos, un solo paso de separación puede agotar las células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, como incubando células con una pluralidad de anticuerpos o parejas de unión, cada una específica para un marcador objetivo de selección negativa. Asimismo, múltiples tipos de células pueden seleccionarse positivamente simultáneamente incubando células con una pluralidad de anticuerpos o parejas de unión expresadas en los diversos tipos de células.

30 [0179] Por ejemplo, en algunos aspectos, subpoblaciones específicas de células T, como células positivas o que expresan altos niveles de uno o más marcadores de superficie, por ejemplo, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ y/o células T CD45RO⁺, se aíslan mediante técnicas de selección positiva o negativa.

35 [0180] Por ejemplo, las células T CD3⁺, CD28⁺ pueden seleccionarse positivamente utilizando perlas magnéticas conjugadas de CD3/CD28 (por ejemplo, DYNABEADS[®] M-450 CD3/CD28 T Cell Expander).

40 [0181] En algunos casos, el aislamiento se lleva a cabo mediante el enriquecimiento de una población celular particular mediante selección positiva, o el agotamiento de una población celular particular mediante selección negativa. En algunos casos, la selección positiva o negativa se logra mediante la incubación de células con uno o más anticuerpos u otro agente de unión que se une específicamente a uno o más marcadores de superficie expresados o expresados (marcador⁺) a un nivel relativamente más alto (marcador^{alto}) en las células seleccionadas positivas o negativas, respectivamente.

45 [0182] En algunos casos, las células T se separan de una muestra de PBMC mediante la selección negativa de marcadores expresados en células no T, como células B, monocitos u otros glóbulos blancos, como CD14. En algunos aspectos, se utiliza un paso de selección de CD4⁺ o CD8⁺ para separar las células T colaboradoras CD4⁺ y las células T citotóxicas CD8⁺. Dichas poblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ pueden clasificarse adicionalmente en subpoblaciones mediante selección positiva o negativa para marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en una o más subpoblaciones de células T naïve, de memoria y/o efectoras.

50 [0183] En algunos casos, las células CD8⁺ se enriquecen o se agotan adicionalmente en células madre de memoria central, memoria efectora y/o memoria central ingenuas, como por selección positiva o negativa basada en antígenos de superficie asociados con la subpoblación respectiva. En algunos casos, el enriquecimiento de células T de memoria central (MTC) se lleva a cabo para aumentar la eficacia, como mejorar la supervivencia a largo plazo, la expansión y/o el injerto después de la administración, que en algunos aspectos es particularmente sólido en tales subpoblaciones. Véase Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. En algunos casos, la combinación de células T CD8⁺ enriquecidas con T_{CM} y células T CD4⁺ mejora aún más la eficacia.

- 5 [0184] En algunos casos, las células T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L⁺ y CD62L⁻ de linfocitos de sangre periférica CD8⁺. Las PBMC se pueden enriquecer o empobrecer en fracciones de CD62L⁻CD8⁺ y/o CD62L⁺CD8⁺, como mediante el uso de anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L.
- 10 [0185] En algunos casos, el enriquecimiento para las células T de memoria central (T_{CM}) se basa en la expresión superficial alta o positiva de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 y/o CD 127; en algunos aspectos, se basa en la selección negativa de células que expresan o expresan mucho CD45RA y/o granzima B. En algunos aspectos, el aislamiento de una población CD8⁺ enriquecida en células T CM se lleva a cabo mediante el agotamiento de las células que expresan CD4, CD14, CD45RA y selección positiva o enriquecimiento de células que expresan CD62L. En un aspecto, el enriquecimiento para células T de memoria central (T_{CM}) se lleva a cabo a partir de una fracción negativa de células seleccionadas en función de la expresión de CD4, que se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA, y una selección positiva basada en CD62L. Dichas selecciones en algunos aspectos se realizan simultáneamente y en otros aspectos se realizan secuencialmente, en cualquier orden. En algunos aspectos, el mismo paso de selección basado en la expresión de CD4 que se usa para preparar la población o subpoblación de células CD8⁺ también se usa para generar la población o subpoblación de células CD4⁺, de modo que se conservan las fracciones positivas y negativas de la separación basada en CD4. y utilizado en pasos posteriores de los métodos, opcionalmente después de uno o más pasos de selección positivos o negativos adicionales.
- 15 [0186] En un ejemplo particular, una muestra de PBMC u otra muestra de glóbulos blancos se somete a selección de células CD4⁺, donde se retienen tanto las fracciones negativas como las positivas. La fracción negativa luego se somete a selección negativa basada en la expresión de CD14 y CD45RA o ROR1, y selección positiva basada en un marcador característico de las células T de memoria central, como CD62L o CCR7, donde las selecciones positivas y negativas se llevan a cabo en ordenar.
- 20 [0187] Los linfocitos T colaboradores CD4⁺ se clasifican en células naïve, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4⁺ se pueden obtener mediante métodos estándar. En algunos casos, los linfocitos T CD4⁺ naïve son células T CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺. En algunos casos, las células CD4⁺ de la memoria central son CD62L⁺ y CD45RO⁺. En algunos casos, las células efectoras CD4⁺ son CD62L⁻ y CD45RO⁻.
- 25 [0188] En un ejemplo, para enriquecer células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En algunos casos, el anticuerpo o la pareja de unión se une a un soporte sólido o matriz, como una perla magnética o una perla paramagnética, para permitir la separación de células para selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, en algunos casos, las células y las poblaciones celulares se separan o aíslan mediante técnicas de separación inmunomagnéticas (o magnéticas por afinidad) (revisadas en Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Editado por: SA Brooks y U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ).
- 30 [0189] En algunos aspectos, la muestra o composición de células a separar se incuba con material pequeño, magnetizable o magnéticamente sensible, como partículas o micropartículas magnéticamente sensibles, como perlas paramagnéticas (p. ej., como Dynalbeads o perlas MACS). El material magnéticamente sensible, p. ej., una partícula, generalmente se une directa o indirectamente a una pareja de unión, p. ej., un anticuerpo, que se une específicamente a una molécula, p. ej., un marcador de superficie, presente en la célula, las células o la población de células que se desea separar, por ejemplo, que se desea seleccionar negativa o positivamente.
- 35 [0190] En algunos casos, la partícula o perla magnética comprende un material magnéticamente sensible unido a un miembro de unión específico, tal como un anticuerpo u otra pareja de unión. Hay muchos materiales magnéticamente sensibles bien conocidos que se utilizan en los métodos de separación magnética. Partículas magnéticas adecuadas incluyen las descritas en Molday, Patente de EE. UU. Nº 4.452.773 y en la especificación de patente europea EP 452342 B. Partículas de tamaño coloidal, como las descritas en Owen Pat. de EE. UU. Nº 4.795.698, y Liberti et al., Patente de EE. UU. Nº 5.200.084 son otros ejemplos.
- 40 [0191] La incubación generalmente se lleva a cabo en condiciones en las que los anticuerpos o parejas de unión, o moléculas, como anticuerpos secundarios u otros reactivos, que se unen específicamente a tales anticuerpos o parejas de unión, que están unidos a la partícula o perla magnética, específicamente se unen a las moléculas de la superficie celular si están presentes en las células dentro de la muestra.
- 45 [0192] En algunos aspectos, la muestra se coloca en un campo magnético, y aquellas células que tienen partículas magnéticamente sensibles o magnetizables unidas a ellas serán atraídas por el imán y separadas de las células no marcadas. Para la selección positiva, se retienen las células que son atraídas por el imán; para la selección negativa, se retienen las células que no son atraídas (células sin marcar). En algunos aspectos, se realiza una combinación de selección positiva y negativa durante el mismo paso de selección, donde las fracciones positivas y negativas se retienen y se procesan más o se someten a más pasos de separación.
- 50 [0193] En ciertos casos, las partículas magnéticamente sensibles están recubiertas de anticuerpos primarios u otras

parejas de unión, anticuerpos secundarios, lectinas, enzimas o estreptavidina. En ciertos casos, las partículas magnéticas se unen a las células a través de un recubrimiento de anticuerpos primarios específicos para uno o más marcadores. En ciertos casos, las células, en lugar de las perlas, se marcan con un anticuerpo primario o una pareja de unión, y luego se añaden partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo secundario específico de tipo celular u otro compañero de unión (p. ej., estreptavidina). En ciertos casos, las partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina se usan junto con anticuerpos primarios o secundarios biotinilados.

5 **[0194]** En algunos casos, las partículas magnéticamente sensibles se dejan unidas a las células que se van a incubar, cultivar y/o manipular posteriormente; en algunos aspectos, las partículas se dejan unidas a las células para su administración a un paciente. En algunos casos, las partículas magnetizables o magnéticamente sensibles se eliminan de las células. Se conocen métodos para eliminar partículas magnetizables de las células e incluyen, por ejemplo, el uso de anticuerpos competitivos no marcados, partículas magnetizables o anticuerpos conjugados con enlazadores escindibles, etc. En algunos casos, las partículas magnetizables son biodegradables.

10 **[0195]** En algunos casos, la selección basada en la afinidad se realiza a través de la clasificación celular activada magnéticamente (MACS) (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Los sistemas de Clasificación de Células Activadas Magnéticamente (MACS) son capaces de una selección de alta pureza de células que tienen partículas magnetizadas unidas a ellas. En ciertos casos, MACS funciona en un modo en el que las especies objetivo y no objetivo se eluyen secuencialmente después de la aplicación del campo magnético externo. Es decir, las células unidas a las partículas 20 magnetizadas se mantienen en su lugar mientras se eluyen las especies no unidas. A continuación, después de que se completa este primer paso de elución, las especies que quedaron atrapadas en el campo magnético y se les impidió eluir se liberan de alguna manera para que puedan eluirse y recuperarse. En ciertos casos, las células no diana se marcan y eliminan de la población heterogénea de células.

15 **[0196]** En ciertos casos, el aislamiento o la separación se lleva a cabo usando un sistema, dispositivo o aparato que lleva a cabo uno o más de los pasos de aislamiento, preparación celular, separación, procesamiento, incubación, cultivo y/o formulación de los métodos. En algunos aspectos, el sistema se utiliza para llevar a cabo cada uno de estos pasos en un ambiente cerrado o estéril, por ejemplo, para minimizar el error, la manipulación por parte del usuario y/o la contaminación. En un ejemplo, el sistema es un sistema como se describe en la solicitud de patente internacional, número de publicación 20 WO2009/072003 o US 20110003380 A1.

25 **[0197]** En algunos casos, el sistema o aparato lleva a cabo uno o más, por ejemplo, todos los pasos de aislamiento, procesamiento, ingeniería y formulación en un sistema integrado o autónomo, y/o de forma automatizada o programable. En algunos aspectos, el sistema o aparato incluye una computadora y/o un programa de computadora en comunicación 30 con el sistema o aparato, que permite al usuario programar, controlar, evaluar el resultado y/o ajustar varios aspectos del procesamiento, aislamiento, pasos de ingeniería y formulación.

35 **[0198]** En algunos aspectos, la separación y/u otros pasos se llevan a cabo utilizando el sistema CliniMACS (Miltenyi Biotic), por ejemplo, para la separación automatizada de células a nivel de escala clínica en un sistema cerrado y estéril. Los componentes pueden incluir una microcomputadora integrada, una unidad de separación magnética, una bomba peristáltica y varias válvulas de manguito. La computadora integrada en algunos aspectos controla todos los componentes 40 del instrumento y dirige el sistema para realizar procedimientos repetidos en una secuencia estandarizada. La unidad de separación magnética en algunos aspectos incluye un imán permanente móvil y un soporte para la columna de selección. La bomba peristáltica controla la tasa de flujo en todo el conjunto de tubos y, junto con las válvulas de manguito, asegura el flujo controlado de tampón a través del sistema y la suspensión continua de las células.

45 **[0199]** El sistema CliniMACS en algunos aspectos utiliza partículas magnetizables acopladas a anticuerpos que se suministran en una solución no pirógena estéril. En algunos casos, después de marcar las células con partículas magnéticas, las células se lavan para eliminar el exceso de partículas. A continuación, se conecta una bolsa de preparación de células al juego de tubos, que a su vez se conecta a una bolsa que contiene tampón y una bolsa de recogida de células. El conjunto de tubos consta de tubos estériles preensamblados, que incluyen una precolumna y una columna de separación, y son para un solo uso. Después de iniciar el programa de separación, el sistema aplica automáticamente la muestra de células en la columna de separación. Las células marcadas se retienen dentro de la columna, mientras que las células no marcadas se eliminan mediante una serie de pasos de lavado. En algunos casos, 50 las poblaciones de células para usar con los métodos descritos en este documento no están marcadas y no se retienen en la columna. En algunos casos, las poblaciones de células para usar con los métodos descritos en este documento se etiquetan y se retienen en la columna. En algunos casos, las poblaciones de células para usar con los métodos descritos en este documento se eluyen de la columna después de eliminar el campo magnético y se recogen dentro de la bolsa de recogida de células.

55 **[0200]** En ciertos casos, la separación y/u otros pasos se llevan a cabo usando el sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). El sistema CliniMACS Prodigy en algunos aspectos está equipado con una unidad de procesamiento celular que permite el lavado y fraccionamiento automático de células por centrifugación. El sistema CliniMACS Prodigy también puede incluir una cámara integrada y un software de reconocimiento de imágenes que determina el punto final de fraccionamiento celular óptimo al discernir las capas macroscópicas del producto celular de origen. Por ejemplo, la sangre periférica puede separarse automáticamente en eritrocitos, glóbulos blancos y capas de plasma. El sistema CliniMACS 60

Prodigy también puede incluir una cámara de cultivo celular integrada que lleva a cabo protocolos de cultivo celular como, por ejemplo, diferenciación y expansión celular, carga de antígenos y cultivo celular a largo plazo. Los puertos de entrada pueden permitir la extracción estéril y la reposición de medios y las células se pueden monitorear usando un microscopio integrado. Véase, por ejemplo, Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood.* 1:72-82, y Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

5 [0201] En algunos casos, una población celular descrita en el presente documento se recoge y se enriquece (o se empobrece) mediante citometría de flujo, en la que las células teñidas para múltiples marcadores de superficie celular se transportan en una corriente fluídica. En algunos casos, una población celular descrita en el presente documento se recoge y enriquece (o empobrece) mediante clasificación a escala preparativa (CCAF). En ciertos casos, una población de células descrita en el presente documento se recolecta y enriquece (o agota) mediante el uso de chips de sistemas microelectromecánicos (MEMS) en combinación con un sistema de detección basado en CCAF (ver, por ejemplo, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573 y Godin et al. (2008) *J Biophoton.* 1(5):355- 376. En ambos casos, las células se pueden marcar con múltiples marcadores, lo que permite el aislamiento de subconjuntos de células T bien definidas de alta pureza.

10 [0202] En algunos casos, los anticuerpos o las parejas de unión se marcan con uno o más marcadores detectables, para facilitar la separación para la selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, la separación puede basarse en la unión a anticuerpos marcados fluorescentemente. En algunos ejemplos, la separación de células basada en la unión de 15 anticuerpos u otros socios de unión específicos para uno o más marcadores de superficie celular se lleva a cabo en una corriente fluídica, como por clasificación de células activadas por fluorescencia (CCAF), incluida la escala preparativa (CCAF) y/o chips de sistemas microelectrónicos (MEMS), por ejemplo, en combinación con un sistema de detección de citometría de flujo. Dichos métodos permiten la selección positiva y negativa basada en múltiples marcadores simultáneamente.

20 [0203] En algunos casos, los métodos de preparación incluyen etapas para congelar, por ejemplo, crioconservar, las células, ya sea antes o después del aislamiento, la incubación y/o la ingeniería. En algunos casos, el paso de congelación y posterior descongelación elimina los granulocitos y, hasta cierto punto, los monocitos en la población celular. En algunos casos, las células se suspenden en una solución congelada, por ejemplo, después de un paso de lavado para eliminar el 25 plasma y las plaquetas. Puede usarse cualquiera de una variedad de soluciones y parámetros de congelación conocidos en algunos aspectos. Un ejemplo implica el uso de PBS que contiene un 20 % de DMSO y un 8 % de albúmina de suero humano (HSA), u otro medio de congelación celular adecuado. A continuación, se diluye 1:1 con medio para que la concentración final de DMSO y HSA sea del 10 % y el 4 %, respectivamente. A continuación, las células se congelan a - 30 80 °C a una velocidad de 1 °C por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido.

35 [0204] En algunos casos, los métodos descritos incluyen etapas de cultivo, incubación, cultivo y/o ingeniería genética. Por ejemplo, en algunos casos, los métodos descritos son para incubar y/o modificar por ingeniería genética las poblaciones de células empobrecidas y las composiciones que inician el cultivo.

40 [0205] Por lo tanto, en algunos casos, las poblaciones de células se incuban en una composición iniciadora de cultivo. La incubación y/o la ingeniería pueden llevarse a cabo en un recipiente de cultivo, como una unidad, cámara, pocillo, columna, tubo, conjunto de tubos, válvula, vial, placa de cultivo, bolsa u otro recipiente para cultivo o cultivar células.

45 [0206] En algunos casos, las células se incuban y/o cultivan antes o en conexión con la ingeniería genética. Los pasos de incubación pueden incluir cultivo, cultivar, estimulación, activación y/o propagación. En algunos casos, las 50 composiciones o células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o un agente estimulador. Dichas condiciones incluyen las diseñadas para inducir la proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de las células en la población, para imitar la exposición al antígeno y/o preparar las células para la ingeniería genética, como para la introducción de un receptor de antígeno recombinante.

55 [0207] Las condiciones pueden incluir uno o más medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, por ejemplo, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimulantes, tales como citoquinas, quimioquinas, antígenos, parejas de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células.

60 [0208] En algunos casos, las condiciones o agentes estimulantes incluyen uno o más agentes, por ejemplo, un ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo TCR. En algunos aspectos, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en una célula T. Dichos agentes pueden incluir anticuerpos, como los específicos para un componente TCR y/o un receptor coestimulador, por ejemplo, anti-CD3, anti-CD28, unidos a un soporte sólido como una perla y/o una o más citocinas. Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además el paso de añadir anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 al medio de cultivo (p. ej., a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 ng/mL). En algunos casos, los agentes estimulantes incluyen IL-2 y/o IL-15, por ejemplo, una concentración de IL-2 de al menos aproximadamente 10 unidades/mL.

65 [0209] En algunos aspectos, la incubación se lleva a cabo de acuerdo con técnicas como las descritas en la Patente de

EE. UU. Nº 6,040,1 77 de Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood.* 1:72-82, y/o Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

5 **[0210]** En algunos casos, las células T se expanden añadiendo a la composición iniciadora de cultivo células alimentadoras, tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que no se dividen (p. ej., de manera que la población de células resultante contiene al menos aproximadamente 5, 10, 20 o 40 o más células alimentadoras de PBMC para cada linfocito T en la población inicial a expandir); e incubar el cultivo (por ejemplo, durante un tiempo suficiente para expandir el número de células T). En algunos aspectos, las células alimentadoras que no se dividen pueden comprender células alimentadoras de PBMC irradiadas con rayos gamma. En algunos casos, las PBMC se irradian con rayos gamma en el rango de aproximadamente 3000 a 3600 rads para evitar la división celular. En algunos aspectos, las células alimentadoras se añaden al medio de cultivo antes de añadir las poblaciones de células T.

10 **[0211]** En algunos casos, las condiciones estimulantes incluyen una temperatura adecuada para el crecimiento de los linfocitos T humanos, por ejemplo, al menos aproximadamente 25 grados Celsius, generalmente al menos aproximadamente 30 grados y generalmente aproximadamente 37 grados Celsius. Opcionalmente, la incubación puede comprender además la adición de células linfoblastoides (LCL) transformadas por EBV que no se dividen como células alimentadoras. LCL se puede irradiar con rayos gamma en el rango de aproximadamente 6000 a 10.000 rads. Las células alimentadoras LCL en algunos aspectos se proporcionan en cualquier cantidad adecuada, tal como una proporción de células alimentadoras LCL a linfocitos T iniciales de al menos aproximadamente 10:1.

15 **[0212]** En algunos casos, las células T específicas de antígeno, tales como las células T CD4⁺ y/o CD8⁺ específicas de antígeno, se obtienen estimulando linfocitos T vírgenes o específicos de antígeno con antígeno. Por ejemplo, se pueden generar líneas o clones de células T específicas de antígeno para antígenos de citomegalovirus aislando células T de sujetos infectados y estimulando las células *in vitro* con el mismo antígeno.

20 ***Vectores y métodos para ingeniería genética***

25 **[0213]** Varios métodos para la introducción de componentes modificados genéticamente, por ejemplo, receptores de antígenos, por ejemplo, CAR o TCR, son bien conocidos y pueden usarse con los métodos y composiciones descritos. Ejemplos de métodos incluyen aquellos para la transferencia de ácidos nucleicos que codifican los receptores, incluso a través de vectores virales, por ejemplo, vectores o transposones retrovirales o lentivirales, no virales, por ejemplo, el sistema de transposones de la *Bella Durmiente*. Los métodos de transferencia de genes pueden incluir transducción, electroporación u otro método que dé como resultado la transferencia de genes a la célula.

30 **[0214]** En algunos casos, la transferencia de genes se logra estimulando primero la célula, como combinándola con un estímulo que induce una respuesta como proliferación, supervivencia y/o activación, por ejemplo, medida por la expresión de una citoquina o marcador de activación, seguido de transducción de las células activadas y expansión en cultivo a cantidades suficientes para aplicaciones clínicas.

35 **[0215]** En algunos contextos, la sobreexpresión de un factor estimulante (por ejemplo, una linfoquina o una citoquina) puede ser tóxica para un sujeto. Por lo tanto, en algunos contextos, las células manipuladas incluyen segmentos de genes que hacen que las células sean susceptibles a la selección negativa *in vivo*, tal como tras la administración en inmunoterapia adoptiva. Por ejemplo, en algunos aspectos, las células están diseñadas para que puedan eliminarse como resultado de un cambio en la condición *in vivo* del paciente al que se administran. El fenotipo seleccionable negativo puede resultar de la inserción de un gen que confiere sensibilidad a un agente administrado, por ejemplo, un compuesto. Los genes seleccionables negativos incluyen el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple tipo I (HSV-I TK) (Wigler et al., *Cell* II:223, 1977) que confiere sensibilidad al ganciclovir; el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa celular (HPRT), el gen de la adenina fosforribosiltransferasa celular (APRT), la citosina desaminasa bacteriana (Mullen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 89:33 (1992)).

40 **[0216]** En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a células utilizando partículas de virus infecciosos recombinantes, tales como, por ejemplo, vectores derivados del virus de simio 40 (SV40), adenovirus, virus adenoasociados (AAV). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células T usando vectores lentivirales recombinantes o vectores retrovirales, como vectores gamma-retrovirales (ver, por ejemplo, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt. 2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 noviembre 29(11): 550-557).

45 **[0217]** En algunos casos, el vector retroviral tiene una secuencia repetida terminal larga (LTR), por ejemplo, un vector retroviral derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV), virus murino de células madre embrionarias (MESV), virus de células madre murinas (MSCV), virus formador de focos de bazo (SFFV) o virus adenoasociados (AAV). La mayoría de los vectores retrovirales se derivan de retrovirus murinos. En algunos casos, los retrovirus incluyen aquellos derivados de cualquier fuente de células de aves o mamíferos. Los retrovirus suelen ser anfotrópicos, lo que significa que son capaces de infectar las células huésped de varias especies, incluidos los seres humanos. En un caso, el gen a expresar reemplaza las secuencias retrovirales gag, pol y/o env. Se han descrito varios sistemas retrovirales ilustrativos (p. ej., Patentes de EE. UU. N°s 5.219.740; 6.207.453; 5.219.740; Miller y Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, AD (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14 Scarpa y otros (1991)

Virology 180:849-852, Burns y otros (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:8033-8037 y Boris-Lawrie y Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109.

5 [0218] Se conocen métodos de transducción lentiviral. Se describen métodos ejemplares en, por ejemplo, Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood 101:1637-1644, Verhoeven et al (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114 y Cavalieri et al (2003) Blood 102(2): 497-505.

10 10 [0219] En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células T mediante electroporación (véase, por ejemplo, Chicaybam et al, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 y Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437). En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes se transfieren a las células T mediante transposición (ver, por ejemplo, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74 15 y Huang y otros (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126). Otros métodos para introducir y expresar material genético en células inmunitarias incluyen transfección con fosfato de calcio (p. ej., como se describe en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, NY), fusión de protoplastos, transfección mediada por liposomas catiónicos; bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de tungsteno (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); y coprecipitación de ADN con fosfato de estroncio (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)).

20 [0220] Otros enfoques y vectores para la transferencia de los ácidos nucleicos que codifican los productos recombinantes son los descritos, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional, número de publicación: WO2014055668 y Patente de EE. UU. número 7.446,190.

25 25 [0221] En algunos casos, las células, por ejemplo, las células T, pueden transfectarse durante o después de la expansión, por ejemplo, con un receptor de células T (TCR) o un receptor de antígeno químérico (CAR). Esta transfección para la introducción del gen del receptor deseado se puede realizar con cualquier vector retroviral adecuado, por ejemplo. La población de células modificadas genéticamente puede entonces liberarse del estímulo inicial (el estímulo CD3/CD28, por ejemplo) y posteriormente estimularse con un segundo tipo de estímulo, por ejemplo, a través de un receptor introducido de novo). Este segundo tipo de estímulo puede incluir un estímulo antigénico en forma de una molécula de péptido/MHC, el ligando afín (entrecrezamiento) del receptor introducido genéticamente (p. ej., ligando natural de un CAR) o cualquier ligando (como un anticuerpo) que se une directamente dentro del marco del nuevo receptor (p. ej., reconociendo regiones 30 constantes dentro del receptor). Véase, por ejemplo, Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 o Barrett y col., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine, vol. 65: 333-347 (2014).

35 35 [0222] Entre los ácidos nucleicos adicionales, por ejemplo, los genes para la introducción son aquellos para mejorar la eficacia de la terapia, tales como promover la viabilidad y/o la función de las células transferidas; genes para proporcionar un marcador genético para la selección y/o evaluación de las células, como para evaluar la supervivencia o localización *in vivo*; genes para mejorar la seguridad, por ejemplo, haciendo que la célula sea susceptible a la selección negativa *in vivo* como describen Lupton SD et al., Mol. y Cell Biol., 11:6 (1991); y Riddell y col., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992); véanse también las publicaciones de PCT/US91/08442 y PCT/US94/05601 de Lupton et al. que describe el uso 40 de genes de fusión seleccionables bifuncionales derivados de la fusión de un marcador seleccionable positivo dominante con un marcador seleccionable negativo. Véase, por ejemplo, Riddell et al., Patente de EE. UU. Nº 6.040,177, en las columnas 14-17.

IV. Composiciones, formulaciones y métodos de administración

45 45 [0223] También se describen composiciones que contienen el receptor químérico, como CAR, y composiciones que contienen las células manipuladas, incluidas las composiciones y formulaciones farmacéuticas. También se describen métodos de uso y usos de las composiciones, como en el tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos en los que se expresa el antígeno, o en métodos de detección, diagnóstico y pronóstico.

1. Composiciones/Formulaciones

50 50 [0224] El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se le administraría la formulación.

55 [0225] Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, entre otros, un tampón, un excipiente, un estabilizador o un conservante.

60 60 [0226] En algunos aspectos, la elección del vehículo está determinada en parte por la célula particular y/o por el método de administración. En consecuencia, hay una variedad de formulaciones adecuadas. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. En algunos aspectos, se utiliza una mezcla de dos o más conservantes. El conservante o mezclas de los mismos están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 2 % en peso de la composición total. Los portadores se describen, por ejemplo, en

Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980). Los vehículos farmacéuticamente aceptables generalmente no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG).

5 [0227] Los agentes tamponadores en algunos aspectos están incluidos en las composiciones. Los agentes tamponadores adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y varios otros ácidos y sales. En algunos aspectos, se usa una mezcla de dos o más agentes tamponantes. El agente tampón o mezclas del mismo están típicamente presentes en una cantidad de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 4 % en peso de la composición total. Se conocen métodos para preparar composiciones farmacéuticas administrables. Los métodos exemplares se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21^a edición. (1 de mayo de 2005).

10 20 [0228] La formulación o composición también puede contener más de un ingrediente activo útil para la indicación, enfermedad o condición particular que se está tratando con las células, preferiblemente aquellos con actividades complementarias a la célula, donde las actividades respectivas no se afectan negativamente entre sí. Dichos ingredientes activos están adecuadamente presentes combinados en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido. Por lo tanto, en algunos casos, la composición farmacéutica incluye además otros agentes o fármacos farmacéuticamente activos, como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

15 30 [0229] La composición farmacéutica en algunos casos contiene células en cantidades efectivas para tratar o prevenir la enfermedad o condición, tal como una cantidad terapéuticamente efectiva o profilácticamente efectiva. La eficacia terapéutica o profiláctica en algunos casos se controla mediante la evaluación periódica de los sujetos tratados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se repite hasta que ocurre la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y pueden determinarse. La dosificación deseada puede administrarse mediante la administración en bolo único de la composición, mediante administraciones en bolo múltiples de la composición o mediante la administración por infusión continua de la composición.

25 40 [0230] Las células pueden administrarse utilizando técnicas, formulaciones y/o dispositivos de administración estándar. Se describen formulaciones y dispositivos, tales como jeringas y viales, para el almacenamiento y administración de las composiciones. La administración de las células puede ser autóloga o heteróloga. Por ejemplo, las células o progenitores inmunesensibles pueden obtenerse de un sujeto y administrarse al mismo sujeto o a un sujeto compatible diferente. Las células inmunesensibles derivadas de sangre periférica o su progenie (p. ej., derivadas *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*) pueden administrarse mediante inyección localizada, incluida la administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica (p. ej., una composición farmacéutica que contiene una célula inmunesensible modificada genéticamente), generalmente se formulará en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión).

35 45 [0231] Las formulaciones incluyen las de administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o en supositorios. En algunos casos, las poblaciones celulares se administran por vía parenteral. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal e intraperitoneal. En algunos casos, las poblaciones de células se administran a un sujeto mediante administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

50 55 [0232] Las composiciones en algunos casos se describen como preparaciones líquidas estériles, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, dispersiones o composiciones viscosas acuosas isotónicas, que en algunos aspectos pueden tamponarse a un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas normalmente son más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Además, las composiciones líquidas son algo más cómodas de administrar, especialmente mediante inyección. Las composiciones viscosas, por otro lado, se pueden formular dentro del rango de viscosidad apropiado para proporcionar períodos de contacto más prolongados con tejidos específicos. Las composiciones líquidas o viscosas pueden comprender vehículos, que pueden ser un disolvente o un medio dispersante que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos.

60 65 [0233] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando las células en un disolvente, mezcladas con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similares.

Las composiciones también se pueden liofilizar. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes (p. ej., metilcelulosa), agentes amortiguadores del pH, gelificantes o aditivos que mejoran la viscosidad, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes y similares, según la vía de administración y la preparación deseada. Los textos estándar pueden consultarse en algunos aspectos para preparar 5 preparaciones adecuadas.

[0234] Se pueden añadir varios aditivos que mejoran la estabilidad y esterilidad de las composiciones, incluidos conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los 10 microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0235] Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad puede lograrse 15 fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

15 2. *Métodos de administración*

[0236] Se describen métodos de administración de células, poblaciones y composiciones, y usos de tales células, 20 poblaciones y composiciones para tratar o prevenir enfermedades, afecciones y trastornos, incluidos los cánceres. En algunos casos, las células, poblaciones y composiciones se administran a un sujeto o paciente que tiene la enfermedad o condición particular que se va a tratar, por ejemplo, a través de terapia celular adoptiva, tal como terapia de células T adoptivas. En algunos casos, las células y las composiciones se administran a un sujeto, como un sujeto que tiene o está 25 en riesgo de padecer la enfermedad o afección. En algunos aspectos, los métodos tratan, por ejemplo, mejoran uno o más síntomas de la enfermedad o afección, como, por ejemplo, disminuyendo la carga tumoral en un cáncer que expresa un antígeno reconocido por un linfocito T manipulado.

[0237] Los métodos para la administración de células para la terapia celular adoptiva son conocidos y pueden usarse en 30 relación con los métodos y composiciones descritos. Por ejemplo, los métodos de terapia de células T adoptivas se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de Patente de EE. UU. Nº 2003/0170238 de Gruenberg et al; Patente de EE. UU. Nº 4.690.915 de Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85. Véase, por ejemplo, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol.* 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Dávila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338.

[0238] Como se usa en el presente documento, un "sujeto" es un mamífero, como un ser humano u otro animal, y 35 normalmente es un ser humano. En algunos casos, el sujeto, por ejemplo, el paciente, al que se administran las células, las poblaciones celulares o las composiciones es un mamífero, normalmente un primate, como un ser humano. En algunos casos, el primate es un mono o un simio. El sujeto puede ser hombre o mujer y puede tener cualquier edad adecuada, incluidos sujetos lactantes, juveniles, adolescentes, adultos y geriátricos. En algunos casos, el sujeto es un mamífero no primate, como un roedor.

[0239] Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, como "tratar" o 40 "tratamiento") se refiere a la mejora o reducción completa o parcial de una enfermedad, afección o trastorno, o un síntoma, efecto adverso o resultado, o fenotipo asociado con el mismo. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier 45 consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o mejor pronóstico. Los términos no implican la curación completa de una enfermedad o la eliminación completa de cualquier síntoma o efecto(s) en todos los síntomas o resultados.

[0240] Como se usa en el presente documento, "retrasar el desarrollo de una enfermedad" significa diferir, dificultar, 50 ralentizar, retardar, estabilizar, suprimir y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (como el cáncer). Este retraso puede variar en la duración del tiempo, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o del individuo que se está tratando. Como es evidente para un experto en la materia, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, abarcar la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolle la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer en etapa tardía, como el desarrollo de 55 metástasis, puede retrasarse.

[0241] "Prevenir", como se usa en el presente documento, incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o 60 recurrencia de una enfermedad en un sujeto que puede estar predisposto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado con la enfermedad. En algunos casos, las células y las composiciones se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para retrasar la progresión de una enfermedad.

[0242] Como se usa en el presente documento, "suprimir" una función o actividad es reducir la función o actividad en 65 comparación con las mismas condiciones excepto por una condición o parámetro de interés, o alternativamente, en comparación con otra condición. Por ejemplo, las células que suprimen el crecimiento del tumor reducen la tasa de crecimiento del tumor en comparación con la tasa de crecimiento del tumor en ausencia de células.

- [0243] Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, células o composición, en el contexto de la administración, se refiere a una cantidad eficaz, en dosis/cantidad y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr un deseado resultado, como un resultado terapéutico o profiláctico.
- 5 [0244] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica o células, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado, como para el tratamiento de una enfermedad, condición o trastorno, y/o efecto farmacocinético o farmacodinámico del tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según factores tales como el estado 10 de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto y las poblaciones de células administradas. En algunos casos, los métodos descritos implican administrar las células y/o las composiciones en cantidades eficaces, por ejemplo, cantidades terapéuticamente eficaces.
- 15 [0245] Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.
- 20 [0246] La enfermedad o afección que se trata puede ser cualquiera en la que la expresión de un antígeno esté asociada con y/o involucrada en la etiología de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, causa, exacerba o de otra manera está involucrada en tal enfermedad, afección, o trastorno. Los ejemplos de enfermedades y condiciones pueden incluir enfermedades o condiciones asociadas con malignidad o transformación de células (por ejemplo, cáncer), enfermedad autoinmune o inflamatoria, o una enfermedad infecciosa, por ejemplo, causada por un patógeno bacteriano, viral u otro. Los antígenos ejemplares, que incluyen antígenos asociados con diversas enfermedades y afecciones que pueden 25 tratarse, se describen anteriormente. En casos particulares, el receptor de antígeno quimérico o TCR transgénico se une específicamente a un antígeno asociado con la enfermedad o condición.
- [0247] En algunos casos, la enfermedad o afección es un tumor, tal como un tumor sólido, linfoma, leucemia, tumor sanguíneo, tumor metastásico u otro tipo de cáncer o tumor.
- 30 [0248] En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección infecciosa, tal como, entre otras, infecciones virales, retrovirales, bacterianas y protozoarias, inmunodeficiencia, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), adenovirus, poliomavirus BK. En algunos casos, la enfermedad o afección es una enfermedad o afección autoinmune o inflamatoria, como artritis, por ejemplo, artritis reumatoide (AR), diabetes tipo I, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, esclerodermia, enfermedad de tiroides autoinmune, enfermedad de 35 Grave, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, asma y/o una enfermedad o condición asociada con el trasplante.
- [0249] En algunos casos, el antígeno asociado con la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en receptor huérfano de tirosina quinasa ROR1, tEGFR, Her2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, mesotelina, CEA y antígeno de la superficie de hepatitis B, receptor antifolato, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, 0EPHa2, 40 ErbB2, 3 o 4, FBP, receptor de acetilcolina fetal, GD2, GD3, HMW -MAA, IL-22R-alfa, IL-13R-alfa2, kdr, cadena ligera kappa, Lewis Y, molécula de adhesión celular L1, MAGE-A1, mesotelina, MUC1, MUC16, PSCA, ligandos NKG2D, NY-ESO-1, MART- 1, gp100, antígeno oncofetal, ROR1, TAG72, VEGF-R2, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico, PSMA, Her2/neu, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, ephrinB2, CD123, CS-1, c- Met, 45 GD-2 y MAGE A3, CE7, Tumor de Wilms 1 (WT-1), una ciclina, como la ciclina A1 (CCNA1), y/o moléculas biotiniladas, y/o moléculas expresadas por VIH, VHC, VHB u otros patógenos.
- [0250] Por lo tanto, los métodos y usos descritos incluyen métodos y usos para la terapia celular adoptiva. En algunos casos, los métodos incluyen la administración de las células o una composición que contiene las células a un sujeto, tejido o célula, como una que tiene, está en riesgo o se sospecha que tiene la enfermedad, condición o trastorno. En algunos 50 casos, las células, poblaciones y composiciones se administran a un sujeto que tiene la enfermedad o afección particular que se va a tratar, por ejemplo, a través de terapia celular adoptiva, tal como terapia de células T adoptivas. En algunos casos, las células o composiciones se administran al sujeto, como un sujeto que tiene o está en riesgo de padecer la enfermedad o afección, mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o afección.
- 55 [0251] En algunos casos, la terapia celular, por ejemplo, la terapia de células T adoptivas, se lleva a cabo mediante transferencia autóloga, en la que las células se aíslan y/o se preparan de otro modo a partir del sujeto que va a recibir la terapia celular, o de una muestra derivada de tal tema. Así, en algunos aspectos, las células se derivan de un sujeto, por ejemplo, un paciente, que necesita un tratamiento y las células, tras el aislamiento y el procesamiento, se administran al mismo sujeto.
- 60 [0252] En algunos casos, la terapia celular, por ejemplo, la terapia de células T adoptivas, se lleva a cabo mediante transferencia alogénica, en la que las células se aíslan y/o se preparan de otro modo a partir de un sujeto que no es un sujeto que va a recibir o que finalmente recibe la terapia celular, por ejemplo, un primer sujeto. En tales casos, las células se administran a continuación a un sujeto diferente, por ejemplo, un segundo sujeto, de la misma especie. En algunos 65 casos, los sujetos primero y segundo son genéticamente idénticos. En algunos casos, los sujetos primero y segundo son genéticamente similares. En algunos casos, el segundo sujeto expresa la misma clase o supertipo HLA que el primer

5 sujeto. Las células pueden administrarse por cualquier medio adecuado. La dosificación y la administración pueden depender en parte de si la administración es breve o crónica. Varios programas de dosificación incluyen, entre otros, administraciones únicas o múltiples en varios puntos de tiempo, administración en bolo e infusión de pulso.

10 5 [0253] En ciertos casos, las células, o poblaciones individuales de subtipos de células, se administran al sujeto en un rango de aproximadamente un millón a aproximadamente 100 mil millones de células y/o esa cantidad de células por kilogramo de peso corporal, tales como, por ejemplo, de 1 millón a aproximadamente 50 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 5 millones de células, aproximadamente 25 millones de células, aproximadamente 500 millones de células, aproximadamente 1 mil millones de células, aproximadamente 5 mil millones de células, aproximadamente 20 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 40 mil millones de células, o un rango definido por cualquiera de los dos valores anteriores), como aproximadamente 10 millones a aproximadamente 100 mil millones de células (por ejemplo, aproximadamente 20 millones de células, aproximadamente 30 millones de células, aproximadamente 40 millones de células, aproximadamente 60 millones de células, aproximadamente 70 millones de células, aproximadamente 80 millones de células, aproximadamente 90 millones de células, aproximadamente 10 mil millones de células, aproximadamente 25 mil millones de células, aproximadamente 50 mil millones de células, aproximadamente 75 mil millones de células, aproximadamente 90 mil millones de células, o un rango definido por cualquiera de los dos valores anteriores), y en algunos casos aproximadamente 100 millones de células a aproximadamente 50 mil millones células (p. ej., aproximadamente 120 millones de células, aproximadamente 250 millones de células, aproximadamente 350 millones de células, aproximadamente 450 millones de células, aproximadamente 650 millones de células, aproximadamente 800 millones de células, aproximadamente 900 millones de células, aproximadamente 3 mil millones de células, aproximadamente 30 mil millones de células, aproximadamente 45 mil millones de células) o cualquier valor entre estos rangos y/o por kilogramo de peso corporal. Nuevamente, las dosis pueden variar dependiendo de los atributos particulares de la enfermedad o trastorno y/o del paciente y/u otros tratamientos.

15 25 [0254] En algunos casos, las células se administran como parte de un tratamiento de combinación, como de forma simultánea o secuencial con, en cualquier orden, otra intervención terapéutica, como un anticuerpo o una célula modificada o un receptor o agente, como un agente citotóxico o agente terapéutico. En algunos casos, las células se coadministran con uno o más agentes terapéuticos adicionales o en conexión con otra intervención terapéutica, ya sea simultánea o secuencialmente en cualquier orden. En algunos contextos, las células se coadministran con otra terapia lo suficientemente próxima en el tiempo como para que las poblaciones de células potencien el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. En algunos casos, las células se administran antes que uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, las células se administran después de uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, uno o más agentes adicionales incluyen una citoquina, como IL-2, por ejemplo, para mejorar la persistencia. En algunos casos, los métodos comprenden la administración de un agente quimioterapéutico.

20 30 35 [0255] Después de la administración de las células, la actividad biológica de las poblaciones de células manipuladas en algunos casos se mide, por ejemplo, mediante cualquiera de varios métodos conocidos. Los parámetros a evaluar incluyen la unión específica de una célula T modificada o natural u otra célula inmunitaria al antígeno, *in vivo*, p. ej., mediante formación de imágenes, o *ex vivo*, p. ej., mediante ELISA o citometría de flujo. En ciertos casos, la capacidad de las células modificadas para destruir las células diana se puede medir utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, como los ensayos de citotoxicidad descritos, por ejemplo, en Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32(7): 689-702 (2009) y Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285(1): 25-40 (2004). En determinados casos, la actividad biológica de las células se mide analizando la expresión y/o secreción de una o más citocinas, como CD 107a, IFNy, IL-2 y TNF. En algunos aspectos, la actividad biológica se mide evaluando el resultado clínico, como la reducción de la carga o carga tumoral.

40 45 [0256] En ciertos casos, las células manipuladas se modifican adicionalmente de varias formas, de manera que se incrementa su eficacia terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, el CAR o TCR manipulado expresado por la población se puede conjugar directa o indirectamente a través de un conector a un resto de direccionamiento. La práctica de conjugar compuestos, por ejemplo, el CAR o el TCR, para seleccionar restos es conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Wadwa et al., *J. Drug Targeting* 3: 1 1 1 (1995) y la Patente de EE. UU. 5.087.616.

VI. DEFINICIONES

50 55 [0257] Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima. Los polipéptidos, incluidos los receptores proporcionados y otros polipéptidos, por ejemplo, enzaladores o péptidos, pueden incluir residuos de aminoácidos que incluyen residuos de aminoácidos naturales y/o no naturales. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación y fosforilación. En algunos aspectos, los polipéptidos pueden contener modificaciones con respecto a una secuencia nativa o natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR.

60 65 [0258] Como se usa en el presente documento, "porcentaje (%) de identidad de secuencia" y "porcentaje de identidad"

5 cuando se usa con respecto a una secuencia de nucleótidos (secuencia de nucleótidos de referencia) se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia candidata (p. ej., el sujeto receptor químico, como una variante del receptor químico) que son idénticos a los residuos de nucleótidos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia se puede lograr de diversas maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando software disponible públicamente como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

10 10 [0259] Como se usa en el presente documento, "correspondiente" con referencia a una posición de una región, tal como "en una posición correspondiente a" o la mención de que una región o posiciones de aminoácidos "corresponden a" una 15 región o posiciones de aminoácidos en una secuencia, tal como se establece en la lista de secuencias, se refiere a las posiciones de aminoácidos identificadas tras la alineación con la secuencia divulgada para maximizar la identidad 20 utilizando un algoritmo de alineación estándar, como el algoritmo GAP. Los residuos correspondientes descritos a modo de ejemplo pueden identificarse mediante el alineamiento de una secuencia con una secuencia de la región de unión de referencia a modo de ejemplo expuesta en SEQ ID NO:5. Al alinear las secuencias, un experto en la técnica puede 25 identificar los residuos o regiones correspondientes, por ejemplo, usando residuos de aminoácidos conservados e idénticos como guías. En general, para identificar las posiciones o regiones correspondientes, las secuencias de aminoácidos se alinean de forma que se obtenga la coincidencia de mayor orden (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, AM, ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, DW, ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, AM, and Griffin, HG, eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073).

30 [0260] El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Ciertos 35 vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan aquí "vectores de expresión". Entre los vectores se encuentran vectores virales, tales como vectores lentivirales.

40 [0261] Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma sin tener en cuenta el número de pasos. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula madre, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la examinada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye aquí.

45 [0262] Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente de lo contrario. Por ejemplo, "un" o "una" significa "al menos uno" o "uno o más". Se entiende que los aspectos y variaciones descritos en este documento incluyen aspectos y variaciones "que consisten" y/o "que consisten esencialmente en".

50 [0263] A lo largo de esta descripción, varios aspectos del tema reivindicado se presentan en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance del objeto reivindicado. En consecuencia, se debe considerar que la descripción de un rango ha revelado específicamente todos los posibles sub-rangos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese rango establecido, está incluido dentro del objeto reivindicado. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños, y también están incluidos dentro del objeto 55 reivindicado, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango establecido incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en el objeto reivindicado. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

60 [0264] El término "aproximadamente" como se usa en este documento se refiere al rango de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "sobre" un valor o parámetro en este documento incluye (y describe) instancias que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "sobre X" incluye la descripción de "X".

65 [0265] Como se usa en el presente documento, una composición se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluidas las células. Puede ser una solución, suspensión, líquido, polvo, pasta, acuoso, no acuoso o cualquier combinación de los mismos.

VIII. Ejemplos

[0266] Los siguientes ejemplos se incluyen solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

5

Ejemplo 1: Análisis de las respuestas inmunitarias del huésped específicas del producto transgénico

[0267] Se obtuvieron muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes y después del tratamiento de cuatro (4) sujetos con neoplasias malignas de células B tratadas con células T autólogas que expresan un CAR específico a CD19. El CAR incluía un scFv anti-CD19 derivado de un anticuerpo murino, un dominio bisagra, un dominio transmembrana CD28, un dominio de señalización intracelular 4-1BB y un dominio de señalización intracelular CD3-zeta. Las células T que expresan CAR también expresaron un EGFR truncado (EGFRt) como marcador sustituto mediante la transducción de células con un vector lentiviral que contiene un ácido nucleico que codifica CAR y un ácido nucleico que codifica el marcador sustituto EGFRt, separados por un dominio de cambio de ribosoma T2A.

15

[0268] Se evaluaron las PBMC antes y después de la infusión (día 42) obtenidas de los sujetos para detectar la presencia o ausencia de respuestas inmunitarias anti-CAR específicas esencialmente como describen Berger et al. Blood. 2006 marzo; 107(6): 2294-2302, Berger et al. J Virol. 2001 enero 75(2): 799-808, Riddell et al. Natural Medicine. 2 de febrero de 1996 (2): 216-223, Berger et al. Blood. 2005 febrero 105(4): 1640-1647. Brevemente, las PBMC (respondedoras) se estimularon *in vitro* con células irradiadas con rayos gamma autólogas transducidas con el CAR expresado por las células administradas (estimuladores en una relación de respuesta a estimulador de 1:1 o 2:1). A continuación, los cultivos se evaluaron en un ensayo de liberación de cromo para determinar la citotoxicidad frente a células T autólogas marcadas con ⁵¹Cr transducidas con CAR ("CD19 CAR") y no transducidas ("simuladas") (objetivos) en varios efectos de efecto a objetivo (E/ T) proporciones. Después de la incubación conjunta, se cuantificó la liberación de cromo y se determinó el porcentaje de lisis máxima alcanzable en cada muestra.

20

[0269] Los resultados de las muestras derivadas de un paciente ejemplar se muestran en la Figura 1, que representa la actividad citolítica de las PBMC antes de la infusión y después de la infusión en el día 42. Mientras que no se detectó actividad citolítica específica para las células diana transducidas con CAR en cualquier cultivo derivado de PBMC previo a la infusión, en dos de los cuatro sujetos evaluados, se detectó actividad lítica específica de CAR en cultivos derivados de muestras de PBMC posteriores a la infusión. Estos resultados indican que las respuestas inmunitarias específicas de CAR pueden desarrollarse después de una única infusión de células T que expresan CAR.

25

[0270] Se llevó a cabo un mapeo de epítopenos para evaluar la(s) región(es) de la CAR reconocida por las respuestas inmunitarias específicas. Las muestras de PBMC antes y después de la infusión se estimularon en presencia de grupos individuales de múltiples péptidos de 15 mer, con secuencias que representan porciones superpuestas (superposición de 11 aminoácidos) de la longitud total de una secuencia de aproximadamente 500 aminoácidos del CAR expresado por las células administradas. Las células se tiñeron con anticuerpos para detectar la expresión superficial de CD8 y CD4 y la expresión intracelular de citoquinas. Se evaluaron veintitrés (23) grupos, cada uno de los cuales contenía diez (10) péptidos y colectivamente incluían 125 péptidos superpuestos individuales, con cada péptido representado en al menos dos de los grupos.

30

[0271] Este diseño permitió la generación de una cuadrícula analítica para evaluar respuestas específicas para péptidos individuales, por lo que un péptido presente en más de un conjunto detectado como aciertos en este ensayo se consideró un acierto de péptido potencialmente inmunogénico. Para los dos pacientes en los que se había detectado una respuesta inmunitaria específica de CAR, se identificaron seis y tres hits de péptidos, respectivamente.

35

[0272] Se realizaron ensayos ELISpot individuales usando un anticuerpo de captura anti-citoquina para evaluar la presencia o ausencia de una respuesta inmune específica para cada uno de estos hits individuales (ver Berger et al. (2006); Berger et al. (2001), Riddell y otros (1996) y Berger y otros (2005), supra). Los resultados de un ensayo ejemplar para un paciente se muestran en la FIG. 2. Se detectaron respuestas inmunitarias específicas contra péptidos con secuencias dentro de la porción V_H del scFv de CAR en ambos pacientes evaluados (incluidas regiones dentro de las regiones FR1, CDR1 y FR2 para un paciente y dentro de FR3 para el otro). Para el primer paciente, también se detectaron respuestas inmunitarias específicas frente a dos péptidos de 15 meros superpuestos, cada uno de los cuales contenía la unión entre el dominio transmembrana y el dominio coestimulador del CAR (etiquetado como "sitio de fusión" en la Figura 2). Estos dos péptidos de 15 unidades superpuestos tenían las secuencias de aminoácidos AFIIFWVKRGRKKLL (SEQ ID NO: 8) y FWVKRGRKKLLYIFK (SEQ ID NO: 9), respectivamente. En otro estudio, luego de la administración con un CAR diferente que tiene un scFv murino, dominios transmembrana y coestimuladores de CD28 y un dominio zeta de CD3, usando métodos similares, también se detectó una respuesta inmune para un sujeto contra un conjunto que contenía porciones V_H de un dominio anti-CD 19 scFv y para otro sujeto en un grupo que contiene porciones de unión.

40

45

50

55

60

[0273] No se detectaron respuestas inmunitarias específicas en los pacientes mediante este ensayo contra péptidos dentro de otras regiones. Por ejemplo, en este ensayo, no se detectaron respuestas específicas contra péptidos que tienen secuencias dentro de otras CDR o regiones marco del scFv, péptidos dentro de regiones del dominio coestimulador o transmembrana pero que no abarcan la unión entre los dos, o péptidos dentro de la región de EGFRt o CD3- ζ del CAR. No se detectaron respuestas inmunitarias específicas frente a secuencias endógenas.

Ejemplo 2: Análisis *in silico* de péptidos derivados de regiones de unión de un CAR para unirse a HLA clase I y HLA clase II

5 [0274] Se usaron herramientas de predicción de epítopos de células T, disponibles en la base de datos de epítopos inmunes y recursos de análisis (IEDB), para análisis *in silico* para predecir las afinidades de unión al MHC y otras propiedades relacionadas con la inmunogenicidad potencial para cada una de una serie de secuencias peptídicas superpuestas dentro de una porción de una secuencia CAR exemplar. La porción incluía un espaciador que tenía un dominio bisagra derivado de inmunoglobulina, un dominio transmembrana CD28 humano, un dominio coestimulador 4-1BB humano y un dominio de señalización CD3zeta humano. En la porción evaluada, el dominio bisagra era un dominio bisagra de IgG4 humana, el dominio transmembrana CD28 comprendía una secuencia expuesta en SEQ ID NO:2 y el dominio coestimulador 4-1BB contenía la secuencia expuesta en SEQ ID NO:3. Por lo tanto, esta porción contenía tres uniones entre diferentes dominios derivados de secuencias humanas (cuyas uniones pueden haber representado sitios de inmunogenicidad potencial contra un CAR tras la administración a un sujeto humano): la unión entre la región espaciadora y el dominio transmembrana, la unión entre el dominio transmembrana y dominio coestimulador, y la unión entre el dominio coestimulador y el dominio de señalización intracelular (véanse las Figuras 3A y 3B).

10 20 [0275] Para identificar porciones de la secuencia que pueden tener propiedades particulares que hacen que sea más probable que se presenten a las células T, se predijeron afinidades para unirse a 27 alelos individuales de HLA de clase I y 56 alelos individuales de HLA de clase II para péptidos superpuestos a lo largo de la longitud de la porción, de 8-14 aminoácidos de longitud y de 15 aminoácidos de longitud (que contienen un núcleo de unión 9-mer), respectivamente. Estos alelos, que representan colectivamente los alelos HLA presentes en más del 99 % de la población mundial, y sus 15 la frecuencia aproximada en la población de los Estados Unidos se enumeran en las Tablas 1A y 1B.

Tabla 1A: HLA clase I		
Clase I	alelo	Frecuencia en la población
1	HLA-A*01:01	12,94
2	HLA-A*02:01	42,88
3	HLA-A*02:03	0,19
4	HLA-A*02:06	1,55
5	HLA-A*03:01	13,50
6	HLA-A*11:01	11,60
7	HLA-A*23:01	8,30
8	HLA-A*24:02	22,56
9	HLA-A*26:01	5,36
10	HLA-A*30:01	6,29
11	HLA-A*30:02	5,21
12	HLA-A*31:01	6,87
13	HLA-A*32:01	3,71
14	HLA-A*33:01	2,62
15	HLA-A*68:01	6,36
16	HLA-A*68:02	4,79
17	HLA-B*07:02	12,96
18	HLA-B*08:01	9,23
19	HLA-B*15:01	6,54
20	HLA-B*35:01	13,03
21	HLA-B*40:01	9,79
22	HLA-B*44:02	7,22
23	HLA-B*44:03	8,96
24	HLA-B*51:01	8,51
25	HLA-B*53:01	7,26
26	HLA-B*57:01	3,49
27	HLA-B*58:01	4,82

Tabla 1B: HLA clase II					
Clase II	alelo	Frecuencia en la población	Clase II	alelo	frecuencia en la población
1	HLA-DRB1*01:01	13,62	29	HLA-DQA1*01:02/DQB1*05:02	21,13
2	HLA-DRB1*15:01	22,86	30	HLA-DQA11*06:02	30,74

(Continuación)

Tabla 1B: HLA clase II

Clase II	alelo	Frecuencia en la población	Clase II	alelo	frecuencia en la población
3	HLA-DRB1*03:01	21,82	31	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	31,56
4	HLA-DRB1*04:01	15,54	32	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:04	19,00
5	HLA-DRB1*11:01	10,92	33	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	80,58
6	HLA-DRB1*13:01	9,86	34	HLA-DQA1*02:01/DQB1*02:02	27,99
7	HLA-DRB1*07:01	19,84	35	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:01	49,92
8	HLA-DRB1*01:01	4,06	36	HLA-DQA1*02:01/DQB1*03:03	23,32
9	HLA-DRB1*01:02	1,85	37	HLA-DQA1*03:03/DQB1*03:03	20,22
10	HLA-DRB1*04:02	6,28	38	HLA-DPA1*01:03/DPB1*01:01	99,83
15	HLA-DRB1*04:05	1,22	39	HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01	99,83
20	HLA-DRB1*04:07	2,78	40	HLA-DPA1*01:03/DPB1*03:01	99,82
25	HLA-DRB1*04:08	1,26	41	HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01	99,88
30	HLA-DRB1*08:04	0,86	42	HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:02	99,86
35	HLA-DRB1*09:01	5,33	43	HLA-DPA1*01:03/DPB1*05:01	99,81
40	HLA-DRB1*10:01	2,78	44	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01	23,54
45	HLA-DRB1*11:02	0,94	45	HLA-DPA1*02:01/DPB1*02:01	24,11
50	HLA-DRB1*11:03	0,74	46	HLA-DPA1*02:01/DPB1*03:01	17,63
55	HLA-DRB1*11:04	4,76	47	HLA-DPA1*02:01/DPB1*04:01	46,73
60	HLA-DRB1*15:02	0,78	48	HLA-DPA1*02:01/DPB1*04:02	38,04
	HLA-DRB1*15:03	1,22	49	HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	13,24
	HLA-DRB1*16:01	4,06	50	HLA-DPA1*02:01/DPB1*06:01	8,59
	HLA-DRB1*16:02	0,84	51	HLA-DPA1*02:01/DPB1*09:01	7,26
	HLA-DRB3*02:02	0,00	52	HLA-DPA1*02:01/DPB1*11:01	9,98
	HLA-DRB3*03:01	0,00	53	HLA-DPA1*02:01/DPB1*13:01	11,55
	HLA-DRB5*01:01	0,00	54	HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	7,98
	HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	30,57	55	01/DPB1 HLA-DPA1*15:01*02:	7,73
	HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01	76,17	56	01/DPB1 HLA-DPA1*17:01*02:	10,40

[0276] Se usaron herramientas de predicción de epítopos de células T basadas en algoritmos disponibles de IEDB para predecir los valores de CI50 para la unión a moléculas HLA de clase I para cada péptido de 8-14 aminoácidos en el conjunto de datos usando ANN (Nielsen et al. al. (2003) Protein Sci., 12:1007-1017 y Lundsgaard et al. (2008) NAR, 36:W509-512) y, en algunos casos, una o más predicciones adicionales utilizando SMM (Peters y Sette (2005) BMC Bioinformatics, 6:132) y comblib (Sidney et al. (2008) Immunome Res. 4:2, o la herramienta Consensus (ver Kim, et al.

(2012) Immune epitope database analysis resource, NAR (combinando predicciones de cualesquiera de los anteriores). Las predicciones de los valores CI50 para la unión a HLA de clase II para cada péptido de 15 aminoácidos en el conjunto de datos se realizaron mediante el método NetMHCIIpan (Karosiene et al. (2013) Immunogenetics 65(10):711; Nielsen y col. (2008) PLoS Comput Biol.4(7)e1000107). Para cada posición individual dentro de la porción de la secuencia de aminoácidos CAR, el número total de secuencias en el conjunto de datos que incluía la posición y se predijo que se uniría a cualquiera de los alelos de clase I o clase II con un CI50 pronosticado de menos de 50 nm estaba determinado. Las Figuras 4A (HLA clase I) y 4B (HLA clase II) muestran los resultados para los alelos de clase I y clase II, respectivamente, que muestran la cobertura posicional a lo largo de la secuencia, en función del número total determinado, ponderado según la frecuencia de los alelos HLA individuales en la población. El área bajo la curva (AUC) en toda la región evaluada fue de aproximadamente 1321 para la unión de HLA de clase I y de 2943 para la unión de HLA de clase II. El AUC para la región del dominio coestimulador transmembrana fue de aproximadamente 931 para la unión de HLA de clase I y de 2212 para la unión de HLA de clase II.

[0277] Como se muestra en las FIGS. 4A y 4B, se predijo mediante este método que ciertas partes de la secuencia contenían fragmentos con mayor probabilidad de unirse bien en los complejos MHC y, por lo tanto, presentarse como epítopos para el reconocimiento potencial por parte de las células T. La afinidad de unión por los alelos HLA por sí sola no predice necesariamente la inmunogenicidad. Dado que los dominios individuales (p. ej., transmembrana, coestimulador) en este ejemplo de CAR eran de origen humano, tras la administración a un sujeto humano, era menos probable que se desarrollaran respuestas inmunogénicas contra un epítopo dentro de cualquiera de estas regiones individuales solas (a diferencia de un epítopo que abarca múltiples regiones que normalmente no están asociadas entre sí y/o que incluye una unión entre tales regiones). Por ejemplo, incluso para un péptido que se predice que se une bien y se presenta en el contexto de una molécula MHC, si el péptido se deriva completamente de una proteína endógena, puede reconocerse como "propio" y, por lo tanto, puede fallar en inducir una respuesta inmunitaria productiva. Por ejemplo, mientras que ciertas regiones completamente dentro de un único dominio transmembrana o citoplásmico puntuaron alto en la predicción de afinidad de unión a HLA, en los resultados descritos en el Ejemplo 1, no se detectaron respuestas inmunitarias contra secuencias peptídicas únicamente dentro de cualquiera de estos dominios. de una secuencia CAR similar. En consecuencia, aunque se observaron varios "puntos calientes" con respecto a la afinidad de unión a HLA predicha, la evaluación y la alteración posteriores se centraron en aquellas áreas que no solo tenían valores de CI50 predichos más altos, sino que también incluían epítopos potenciales que abarcaban la unión entre diferentes dominios derivados de dos proteínas diferentes.

[0278] En particular, se evaluó adicionalmente una región de unión que incluye uno o más epítopos de péptidos potenciales que abarcan la unión del dominio transmembrana CD28 y el dominio de señalización 4-1BB del CAR ejemplar. Con respecto a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 5, que incluye el dominio transmembrana CD28 humano ejemplar (SEQ ID NO: 2) y el dominio coestimulador 4-1BB humano ejemplar (SEQ ID NO: 3), la región de unión evaluada contenía 13 aminoácidos a cada lado de la unión que abarca la transmembrana CD28 y los dominios coestimuladores 4-1BB de la siguiente manera: FWVLVVVGGLACYS**SLLVTVAFIIFWV**KRGK**LLYIFKQ**PFMRPVQTTQEDGCSC RFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:5), en el que una región de unión de 26 aminoácidos se indica en negrita, y los dos los aminoácidos sólo C' y N' de la unión entre los dominios se indican mediante subrayado. La región de unión de 26 aminoácidos evaluada se establece en SEQ ID NO: 137 y corresponde a los residuos de aminoácidos 15 a 40 de la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 5.

[0279] Se llevó a cabo el modelado *in silico* para identificar una o más modificaciones de aminoácidos (mutaciones) dentro de la región de unión de 26 aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 137, lo que dio como resultado fragmentos peptídicos que se predijo que se unirían con valores altos de CI50 para alelos de clase I y clase II y, por lo tanto, era probable que redujeran el potencial para inducir inmunogenicidad contra un CAR que contenía esta región. Específicamente, se hicieron predicciones para fragmentos peptídicos variantes de la región de unión que contenían una o más mutaciones en las posiciones de los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 14, 17 y 20 con numeración con referencia a SEQ ID NO: 137 (que corresponden a una o más mutaciones en posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones 28, 31 y 34 con numeración con referencia a SEQ ID NO: 5). En este estudio ejemplar, estos residuos se eligieron para un análisis posterior después de la mutagénesis *in silico* y las predicciones de unión de todos los epítopos de alta afinidad en los que se examinaron todos los posibles reemplazos de aminoácidos individuales en ese epítopo para determinar su impacto en los valores CI50 predichos. Se identificaron los residuos que dieron como resultado mayores predicciones de CI50 (disminución de la unión), lo que identificó a los residuos anteriores como sensibles a los reemplazos.

[0280] Se evaluaron una serie de diferentes regiones de unión variantes, cada una de las cuales contenía uno o más reemplazos de aminoácidos en la(s) posición(es) evaluada(s), en comparación con la región de unión no mutada dentro de la secuencia CAR ejemplar. Se eligió un subconjunto ejemplar de reemplazos de aminoácidos en las posiciones identificadas que pueden ser menos perjudiciales para la estructura o función de la región transmembrana del dominio de señalización coestimulador. Además, se eligieron reemplazos que pueden impactar en más de un epítopo a la vez, ya que los epítopos se superponen. Específicamente, las regiones de unión de variantes individuales contenían las siguientes modificaciones (reemplazos de aminoácidos): K28A, K28H, K28L, K28Q, K28S, R31A, R31H, R31L, R31N, R31S, L34A, L34S, K28Q/R31A, K28Q/R31N, K28Q/ R31S, K28Q/L34A, K28Q/L34S, R31N/L34A, R31N/L34S, K28Q/R31N/L34A, K28Q/R31N/L34S, con numeración con referencia a SEQ ID NO:5.

[0281] Para las regiones de unión no variantes y variantes, se obtuvieron puntuaciones de inmunogenicidad ponderadas

para los alelos de clase I y clase II, usando las herramientas de predicción de epítopenos de células T disponibles de IEDB. Las puntuaciones se derivaron utilizando los valores CI50 predichos para cada serie de péptidos superpuestos de 8 a 14 unidades (para cada uno de los 27 alelos HLA clase I, individualmente) y una serie de péptidos superpuestos de 15 unidades (para cada uno de los 56 alelos HLA clase II, individualmente) dentro de la respectiva región de unión de 26 aminoácidos (variante o no variante), y se ponderaron en función de la frecuencia relativa en la población de los alelos individuales HLA clase I y clase II. Una puntuación relativa más alta es indicativa de un grado más alto de unión predicha.

5 [0282] Los resultados se exponen en la FIG. 5. Los resultados demuestran la capacidad de disminuir la puntuación de inmunogenicidad de clase I de HLA general prevista dentro de una región de unión CAR mediante la modificación de aminoácidos dentro de la región. Los resultados también confirman la capacidad de reducir la afinidad de unión predicha de HLA de clase I (y por lo tanto la puntuación de inmunogenicidad predicha reducida) sin dar como resultado un aumento sustancial en la puntuación de inmunogenicidad predicha para la unión de HLA de clase II. Por lo tanto, en general, los resultados mostraron que la(s) modificación(es) de aminoácidos dentro de una región que abarca una unión entre un dominio transmembrana CD28 y un dominio coestimulador 4-1BB de un CAR podrían realizarse y efectuar una reducción 10 general en la afinidad predicha por humanos Unión de HLA, que sería consistente con una reducción en el potencial de inmunogenicidad, tras la administración a un sujeto humano, de un receptor químico idéntico a un receptor que tiene esta región, pero que contiene la modificación o combinación de modificaciones en esta región.

15

20 **Ejemplo 3: Comparación del análisis *in silico* y la unión *in vitro* de péptidos derivados de las regiones de unión de un CAR para la unión a HLA de clase I**

25 [0283] Afinidades de unión reales para ciertos alelos de HLA de clase I (A*02:01, A*03: 01, A*11:01 y B*08:01) se evaluaron *in vitro* en busca de secuencias peptídicas de 9 aminoácidos superpuestas ejemplares dentro de una porción de la región de unión de 26 aminoácidos que abarca la unión CD28 y 4-1BB. Específicamente, la evaluación fue de una serie de péptidos de 9 unidades superpuestos derivados de la secuencia VAIFIIFWVKRGRKKLL (establecida en SEQ ID NO: 7), que contiene una porción del dominio transmembrana CD28 y el dominio coestimulador 4-1BB que abarca la unión entre los dominios (enlace que une los dos aminoácidos señalados en subrayado). Además, también se evaluó una serie de péptidos 9-meros superpuestos de cada una de las diferentes variantes de esta porción, cada variante contenía una mutación o mutaciones en esta región como se describe en el Ejemplo 2.

30 [0284] Los diversos péptidos 9-meros los péptidos superpuestos se sintetizaron y su pureza se probó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. A continuación, los péptidos sintéticos se incubaron con moléculas MHC recombinantes para evaluar las propiedades de unión mediante el sistema REVEAL Epitope Discovery System, que es un ensayo de unión de alto rendimiento que mide el grado en que cada péptido es capaz de estabilizar un complejo 35 ternario MHC-péptido (ProImmune, Oxford, Reino Unido). Cada péptido se analizó por separado para esta capacidad con respecto a cada uno de los alelos HLA de clase I, normalizados al grado observado para un control positivo (epítopo de células T conocido para el alelo relevante). Los resultados se informan como una puntuación, en la que la unión se normalizó con el péptido de control positivo establecido en 100 %. En este análisis, generalmente se consideró que una puntuación superior a 50 representaba una unión de buena o alta afinidad.

40 [0285] Los resultados se compararon con los valores de unión previstos (CI50) obtenidos para la unión del mismo péptido: complejo MHC, usando los métodos de predicción *in silico* como se describe en el Ejemplo 2. Dado que el valor máximo de CI50 previsto fue de aproximadamente 50.000, los valores de CI50 se transformaron logarítmicamente, se restaron de LOG(50000) y se dividieron por LOG(50000) para obtener una puntuación *in silico* normalizada ((Log(50000)-logCI50)/Log(50000)). En este análisis, generalmente se consideró que una puntuación de predicción de unión *in silico* 45 superior a 2,0 representaba una unión de buena o alta afinidad predicha.

[0286] Los resultados se exponen en la Tabla 2A (HLA-A*02:01 y HLA-A*03:01) y la Tabla 2B (HLA-A*11:01 y HLAB*08:01). En general, las predicciones de unión *in silico* fueron predictivas de los resultados reales de unión *in vitro*. 50 En algunos casos, se predijo *in silico* una unión relativamente mayor, pero no se observó en el ensayo *in vitro*.

[0287] Los resultados también fueron consistentes con la afinidad de unión predicha siendo generalmente predictiva de la afinidad medida en el ensayo *in vitro*. Además, los resultados demostraron una reducción exitosa de la afinidad de unión a un HLA mediante modificaciones dentro de una región de unión, y que era posible modificar la secuencia de una manera que resultó en una menor afinidad de unión predicha o real o puntaje de uno de los potenciales epítopenos superpuestos, sin aumentar (o al mismo tiempo reducir) la afinidad de unión o la puntuación por otro de los epítopenos superpuestos que contienen el mismo residuo. En algunos casos, dichas mutaciones o modificaciones pueden ser particularmente ventajosas. Como un ejemplo no limitativo de los resultados, las modificaciones K28L, R31H, L34S y/o L34A, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO: 5, generalmente dieron como resultado una afinidad o puntuación de unión prevista o real reducida para al menos un alelo HLA y/o por al menos un péptido dentro de la región evaluada, sin dar como resultado una mayor afinidad de unión a otro alelo HLA y/o sin dar como resultado una mayor afinidad de unión por otro péptido.

Tabla 2A: Unión MHC in silico e in vitro de péptidos variantes										
5	Péptido de referencia superpuesto	Secuencia de péptidos	Mutación	A*02:01			A*03:01			SEQ ID NO,
				IEDB CI50	Puntuación In Silico	Puntuación in vitro	IEDB CI50	In silico	In vitro	
10	1	VAIFI FWVK	ninguno	19617	0,41	0,70	262	2,28	1,50	16
	2	AFI FWVKR	ninguno	25314	0,30	0,50	17846	0,45	5,70	17
	3	FI FWVKRKG	ninguno	7967	0,80	10,10	23693	0,32	1,40	18
	4	I FWVKRGR	ninguno	24769	0,31	1,70	406	2,09	24,30	19
	5	IFWVKRGRK	ninguno	30463	0,22	4,50	3482	1,16	20,50	20
	6	FWVKRGRKK	ninguno	28878	0,24	3,50	17327	0,46	2,20	21
	7	WVKRGRKKL	ninguno	27956	0,25	1,40	22961	0,34	13,10	22
15	1	VAIFI FWVS	K28S	12273	0,61	70,60	22660	0,34	0,70	23
	2	AFI FWVSR	K28S	23924	0,32	4,50	18157	0,44	0,30	24
	3	FI FWVSRG	K28S	3382	1,17	0,20	21751	0,36	0,10	25
	4	I FWVSRGR	K28S	21442	0,37	2,60	155	2,51	25,30	26
	5	IF FWVSRGRK	K28S	30615	0,21	1,30	1880	1,42	39,20	27
	6	FWVSRGRKK	K28S	28679	0,24	1,50	17832	0,45	2,90	28
	7	WVSRGRKKL	K28S	23551	0,33	2,30	22394	0,35	2,10	29
20	1	VAIFI FWVL	K28L	1336	1,57	0,20	20145	0,39	0,00	30
	2	AFI FWVLR	K28L	22444	0,35	5,70	15583	0,51	0,30	31
	3	FI FWVLRG	K28L	2037	1,39	7,20	20853	0,38	0,10	32
	4	I FWVLRGR	K28L	17613	0,45	8,40	238	2,32	2,80	33
	5	IF FWVLRGRK	K28L	30293	0,22	2,90	3675	1,13	19,50	34
	6	FWVLRGRKK	K28L	28857	0,24	3,30	16996	0,47	0,40	35
	7	WVLRGRKKL	K28L	19522	0,41	2,40	23063	0,34	0,70	36
25	1	VAIFI FWVH	K28H	23252	0,33	3,10	10359	0,68	0,30	37
	2	AFI FWVHR	K28H	22819	0,34	0,30	18506	0,43	0,30	38
	3	FI FWVHRG	K28H	1691	1,47	37,30	22930	0,34	0,00	39
	4	I FWVHRGR	K28H	23573	0,33	4,70	326	2,19	30,10	40
	5	IF FWVHRGRK	K28H	29930	0,22	7,10	1062	1,67	37,80	41
	6	FWVHRGRKK	K28H	28189	0,25	1,60	17052	0,47	3,60	42
	7	WVHRGRKKL	K28H	25035	0,30	1,60	22278	0,35	3,40	43
30	1	VAIFI FWVA	K28A	2733	1,26	28,50	21010	0,38	0,00	44
	2	AFI FWVAR	K28A	23072	0,34	2,20	17755	0,45	0,50	45
	3	FI FWVARG	K28A	1902	1,42	22486	0,35	102		
	4	I FWVARGR	K28A	22077	0,36	9,60	206	2,39	18,60	46
	5	IF FWVARGRK	K28A	30251	0,22	1,00	3893	1,11	53,70	47
	6	FWVARGRKK	K28A	28353	0,25	13,50	16210	0,49	5,00	48
	7	WVARGRKKL	K28A	22630	0,34	8,80	22548	0,35	1,30	49
35	1	VAIFI FWVQ	K28Q	17921	0,45	5,30	22927	0,34	0,20	50
	2	AFI FWVQR	K28Q	24165	0,32	0,40	19279	0,41	0,20	51
	3	FI FWVQRG	K28Q	4152	1,08	16,80	23136	0,33	0,40	52
	4	I FWVQRGR	K28Q	21783	0,36	5,80	231	2,34	18,00	53
	5	IF FWVQRGRK	K28Q	30704	0,21	6,10	3177	1,20	36,70	54
	6	FWVQRGRKK	K28Q	29501	0,23	5,20	18619	0,43	6,40	55
	7	WVQRGRKKL	K28Q	24480	0,31	8,10	23630	0,33	4,90	56
40	4	I FWVKGGS	R31S	18902	0,42	13,60	19450	0,41	16,20	57
	5	IF FWVKGSK	R31S	29391	0,23	2,40	3348	1,17	10,40	58
	6	FWVKGSKK	R31S	28317	0,25	1,90	14227	0,55	5,90	59
	7	WVKGSKKL	R31S	23485	0,33	3,00	22637	0,34	1,90	60
	4	I FWVKGRL	R31L	2692	1,27	82,20	16661	0,48	15,90	61
	5	IF FWVKGRLK	R31L	29250	0,23	2,40	1973	1,40	26,90	62
	6	FWVKGRLKK	R31L	27554	0,26	9,40	14434	0,54	2,70	63
45	7	WVKGRLKKL	R31L	20709	0,38	24,50	22985	0,34	10,00	64
	4	I FWVKGGRH	R31H	27453	0,26	5,30	1665	1,48	26,60	65
	5	IF FWVKGGRH	R31H	29806	0,22	2,20	3806	1,12	9,00	66
	6	FWVKGGRHK	R31H	27689	0,26	2,60	16743	0,48	4,10	67
	7	WVKGGRHKL	R31H	25923	0,29	3,90	22313	0,35	1,40	68
	4	I FWVKGGRGA	R31A	6107	0,91	85,90	16069	0,49	42,90	69
	5	IF FWVKGRAK	R31A	29354	0,23	13,80	3470	1,16	22,00	70
60										
65										

(Continuación)

Tabla 2A: Unión MHC in silico e in vitro de péptidos variantes										
5	Péptido de referencia superpuesto	Secuencia de péptidos	Mutación	A*02:01			A*03:01			SEQ ID NO,
				IEDB CI50	Puntuación In Silico	Puntuación in vitro	IEDB CI50	In silico	In vitro	
10	6	FWVKRGAKK	R31A	28151	0,25	4,30	17066	0,47	4,70	71
	7	WVKRGAKKL	R31A	24746	0,31	4,70	22982	0,34	4,10	72
	4	IIFWVKRGN	R31N	25979	0,28	9,30	18552	0,43	4,30	73
	5	IFWVKRGNK	R31N	29978	0,22	3,50	2669	1,27	8,00	74
	6	FWVKRGNKK	R31N	28430	0,25	8,70	17713	0,45	3,60	75
	7	WVKRGNKKL	R31N	24790	0,30	2,40	22813	0,34	0,90	76
	4	IIFWVQRGS	K28Q/R3 1S	14326	0,54	22,40	17741	0,45	4,50	77
15	5	IFWVQRGSK	K28Q/R3 1S	29540	0,23	33,50	3052	1,21	20,30	78
	6	FWVQRGSKK	K28Q/R3 1S	28907	0,24	0,80	15992	0,50	1,90	79
	7	WVQRGSKKL	K28Q/R3 1S	18121	0,44	4,40	23279	0,33	1,20	80
	4	IIFWVQRGA	K28Q/R3 1A	2658	1,27	95,30	13467	0,57	2,70	81
	5	IFWVQRGAK	K28Q/R3 1A	29482	0,23	11,70	3205	1,19	17,00	82
	6	FWVQRGAKK	K28Q/R3 1A	28792	0,24	2,20	18649	0,43	2,70	83
	7	WVQRGAKKL	K28Q/R3 1A	20217	0,39	3,00	23651	0,33	2,00	84
20	4	IIFWVQRGN	K28Q/R3 EN	23103	0,34	13,00	16590	0,48	3,60	85
	5	IFWVQRGNK	K28Q/R3 EN	30164	0,22	16,10	2438	1,31	23,20	86
	6	FWVQRGNKK	K28Q/R3 EN	29113	3,10	19165	0,42	1,30	87	
	7	WVQRGNKKL	K28Q/R3 EN	19790	0,40	4,30	23457	0,33	1,50	88
	7	WVKRGRKKS	L34S	30812	0,21	3,90	25365	0,29	0,90	89
	7	WVKRGRKKA	L34A	28556	0,24	4,50	24086	0,32	0,90	90
	7	WVQRGNKKS	K28Q/L3 4S	26883	0,27	1,20	25680	0,29	0,70	91
25	7	WVQRGNKKA	K28Q/L3 4A	21998	0,36	1,90	24564	0,31	1,20	92
	1	VAFIIFWVR	K28R	20045	0,40	1,20	5746	0,94	0,70	100
	2	AFIIFWVRR	K28R	25059	0,30	1,40	17924	1,00	101	

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 2B: Unión MHC in silicio e in vitro de péptidos variantes

Péptido referencia superpuesto	de péptidos	Secuencia de péptidos	Mutación	A*11:01			B*08:01			SEQ ID NO.
				IEDB C150	Puntuación Silico	In vitro	IEDB C150	Puntuación Silico	In vitro	
1	VAFIFWVK	wt	19	3,42	109,20	15806	0,50	0,30	0,30	16
2	AFIFFWVKR	wt	3271	1,18	25,90	23244	0,33	1,90	0,10	17
3	FIIFWVKRG	wt	22946	0,34	0,40	18081	0,44	0,10	0,00	18
4	IIFWVKRGR	wt	706	1,85	54,50	23025	0,34	0,00	0,00	19
5	IFWVKRGRK	wt	9701	0,71	29,30	23513	0,33	0,40	0,40	20
6	FWVKRGRKK	wt	22175	0,35	6,50	21764	0,36	0,00	0,00	21
7	WVKRGRKKL	wt	24020	0,32	4,80	225	2,35	28,50	28,50	22
1	VAFIFWVS	K28S	12403	0,61	25,10	13796	0,56	0,10	0,10	23
2	AFIFFWVS	K28S	2175	1,36	54,00	21862	0,36	0,30	0,30	24
3	FIIFWVS	K28S	20651	0,38	5,10	17854	0,45	0,40	0,40	25
4	IIFWVS	K28S	162	2,49	68,90	23445	0,33	0,00	0,00	26
5	IFWVS	K28S	5778	0,94	39,20	23448	0,33	0,00	0,00	27
6	FWVS	K28S	21126	0,37	6,30	23067	0,34	0,00	0,00	28
7	WVS	K28S	23684	0,32	4,40	3208	1,19	6,20	6,20	29
1	VAFIFWVL	K28L	14191	0,55	0,20	1196	1,62	0,00	0,00	30
2	AFIFFWVL	K28L	850	1,77	17,20	23012	0,34	0,20	0,20	31
3	FIIFWVLRG	K28L	19162	0,42	2,40	17427	0,46	0,20	0,20	32
4	IIFWVLRG	K28L	185	2,43	35,20	23298	0,33	0,40	0,40	33
5	IFWVLRGK	K28L	6386	0,89	29,30	23324	0,33	0,00	0,00	34
6	FWVLRGKK	K28L	21862	0,36	5,00	23437	0,33	0,00	0,00	35
7	WVLRGKKL	K28L	23725	0,32	3,20	1342	1,57	4,00	4,00	36
1	VAFIFWVH	K28H	1209	1,62	12,30	16202	0,49	0,00	0,00	37
2	AFIFWVHR	K28H	4939	1,01	34,90	22682	0,34	0,30	0,30	38
3	FIIFVVRG	K28H	19850	0,40	0,90	17464	0,46	0,20	0,20	39
4	IIFVVRGR	K28H	196	2,41	77,50	22662	0,34	0,20	0,20	40
5	IFWWHGRK	K28H	7133	0,85	36,60	22030	0,36	0,10	0,10	41
6	FWVHGRKK	K28H	22214	0,35	5,60	23778	0,32	0,00	0,00	42
7	WVHGRKKL	K28H	23844	0,32	5,60	814	1,79	19,20	19,20	43
1	VAFIFWVA	K28A	12499	0,60	2,80	5131	0,99	0,00	0,00	44
2	AFIFWVAR	K28A	2784	1,25	51,80	21850	0,36	0,20	0,20	45
3	FIIFVVAR	K28A	20922	0,38	18463	0,43	102	0,33	0,33	46
4	IIFWVARGR	K28A	239	2,32	70,60	23580	0,33	0,30	0,30	46

(Continuación)

Tabla 2B: Unión MHC in silico e in vitro de péptidos variantes

Péptido de referencia superpuesto	Secuencia de péptidos	Mutación	A*11:01		B*08:01	
			IEDB C150	Puntuación In Silico	IEDB C150	Puntuación In Silico
5	I FVV A RGRK	K28A	8772	0,76	23612	0,33
6	F WV A RGRKK	K28A	20762	0,38	23035	0,34
7	W V A RGRKKL	K28A	23920	0,32	2821	1,25
1	V A F WV Q	K28Q	15477	0,51	14875	0,53
2	A F I FWV Q R	K28Q	2174	1,36	23016	0,34
3	F IFWV Q RG	K28Q	22161	0,35	17653	0,45
4	I IFWV Q RGR	K28Q	361	2,14	23548	0,33
5	I FWV Q RGRK	K28Q	9561	0,72	23670	0,32
6	F WV Q GRKK	K28Q	22394	0,35	22604	0,34
7	W V Q RGRKKL	K28Q	23688	0,32	2512	1,30
4	I IFWV Q RGS	R31S	18923	0,42	100,00	22325
5	I FWV Q RGSK	R31S	7476	0,83	47,90	0,35
6	F WV Q RGSKK	R31S	19910	0,40	5,60	20823
7	W V Q RGSKKL	R31S	24090	0,32	11,80	585
4	I IFWV Q RGL	R31L	20182	0,39	32,40	17368
5	I FWV Q RGLK	R31L	4201	1,08	61,10	23537
6	F WV Q RGLKK	R31L	17309	0,46	25,30	20839
7	W V Q RGLKKL	R31L	24095	0,32	22,10	765
4	I IFWV Q RGH	R31H	7117	0,85	19,50	23227
5	I FWV Q RGHK	R31H	10783	0,67	30,90	23461
6	F WV Q RGHKK	R31H	17635	0,45	27,60	20754
7	W V Q RGHKKL	R31H	23924	0,32	2,80	269
4	I IFWV Q RGA	R31A	19134	0,42	22,60	19585
5	I IFWV Q RGA	R31A	8311	0,78	69,70	21592
6	F WV Q RGA	R31A	20234	0,39	13,20	21762
7	W V Q RGA	R31A	23857	0,32	4,60	1366
4	I IFWV Q RGN	R31N	19351	0,41	42,10	22864
5	I FWV Q RGNK	R31N	6780	0,87	45,90	24238

(Continuación)

Tabla 2B: Unión MHC in silico e in vitro de péptidos variantes

Péptido de referencia superpuesto	Secuencia de péptidos	Mutación	A*1:01			B*08:01		
			IEDB C150	Puntuación In Silico	Puntuación In vitro	IEDB C150	Puntuación In Silico	Puntuación In vitro
6	FWVKRGNKK	R31N	20732	0,38	7,30	21565	0,37	0,10
7	WVKRGNKKL	R31N	24036	0,32	4,10	1181	1,63	75
4	IIFWVQRGS	K28Q/R31S	18031	0,44	16,90	22961	0,34	65,90
5	IFWVQRGSK	K28Q/R31S	7300	0,84	103,30	22846	0,34	0,10
6	FWVQRGSKK	K28Q/R31S	20419	0,39	6,80	21853	0,36	77
7	WVQRGSKKL	K28Q/R31S	23740	0,32	5,90	5230	0,98	0,00
4	IIFWVQRGA	K28Q/R31A	18055	0,44	56,50	20759	0,38	80
5	IFWVQRGAK	K28Q/R31A	8237	0,78	61,30	22801	0,34	0,20
6	FWVQRGAKK	K28Q/R31A	20696	0,38	18,30	22612	0,34	81
7	WVQRGAKKL	K28Q/R31A	23552	0,33	3,80	8314	0,78	0,20
4	IIFWVQRGN	K28Q/R31N	18437	0,43	29,00	23425	0,33	82
5	IFWVQRGNK	K28Q/R31N	6566	0,88	67,50	24059	0,32	0,00
6	FWVQRGNKK	K28Q/R31N	21228	0,37	5,90	22436	0,35	83
7	WVQRGNKKL	K28Q/R31N	23751	0,32	10,70	7869	0,80	0,00
7	WVKRGRKKS	L34S	23906	0,32	6,70	10345	0,68	11,40
7	WVKRGRKKA	L34A	23864	0,32	3,10	1225	1,61	84
7	WVQRGNKKS	K28Q/L34S	23612	0,33	5,00	21235	0,37	0,00
7	WVQRGNKKA	K28Q/L34A	23576	0,33	0,80	14247	0,55	91
1	VAFIIFWVR	K28R	108	2,67	34,60	16290	0,49	0,70
2	AFIIFWVRR	K28R	3387	1,17	1,50	22717	0,34	100
							0,30	101

Ejemplo 4: Análisis de péptidos derivados de la región de unión de un CAR para unirse a HLA-A2:01

[0288] Para identificar péptidos derivados de CAR potencialmente capaces de inducir respuestas inmunogénicas, una serie de péptidos superpuestos dentro de la secuencia no variante (referencia) que contiene la unión entre el dominio transmembrana de CD28 y el dominio coestimulador 4-1BB de un CAR se evaluaron *in silico*. Se usaron algoritmos para predecir las afinidades de unión por el surco peptídico de una molécula MHC de clase I humana común (HLA-A2:01) usando análisis *in silico* para predecir la afinidad por la unión. Como se establece en la FIG. 3, la porción evaluada del CAR tenía la secuencia CYSLLTVVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF (establecida en SEQ ID NO: 6), que contiene una porción del dominio transmembrana CD28 (establecido en SEQ ID NO: 2) y una porción del dominio 4-coestimulador 1BB (expuesto en SEQ ID NO: 3), con los residuos que abarcan la unión de los dominios que se muestran subrayados. La afinidad de unión prevista de HLA-A2:01 se evaluó *in silico* para una serie de 140 péptidos superpuestos de 8-14 aminoácidos de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6. Treinta y cinco (35) de los péptidos contenían solo la secuencia de la porción del dominio transmembrana; 35 de los péptidos contenían sólo la porción del dominio coestimulador y 70 de los péptidos tenían una secuencia de unión o región de fusión, que contenía residuos de aminoácidos que unían la unión entre los dominios. Para esta evaluación, se predijo que los fragmentos peptídicos que se predijo que se unirían a HLA-A2:01 con una constante de disociación de 0 nM a 50 nM se unirían con alta afinidad. Se consideró que los fragmentos de péptidos que se predijo que se unirían con una constante de disociación de 51 nM a 1000 nM se unirían con baja afinidad. Los fragmentos de péptidos que se predijo que se unirían con una afinidad predicha de 1000 nM a 5000 nM se consideraron predichos para unirse con una afinidad rara. Los resultados se presentan en la FIG. 3.

[0289] Como se muestra en la FIG. 3, se predijo que dos de los péptidos derivados de la secuencia de referencia en esta región, cada uno de los cuales contenía una secuencia con una región superpuesta que abarcaba la unión entre los dominios, presentaban una baja afinidad de unión por HLA-A2:01. Específicamente, se predijo que un péptido de 14 unidades con la secuencia IIIFWVKRGRKKLL (SEQ ID NO: 10) se uniría con una constante de disociación de 294 nM, y se predijo que un péptido de 13 unidades con la secuencia IIIFWVKRGRK~~K~~L (SEQ ID NO: 11) se predijo que se uniría con una constante de disociación de 618 nM. Cada uno de estos péptidos incluía una porción del péptido de 15 unidades establecido en SEQ ID NO: 8 e identificado en el Ejemplo 1. No se predijo que los péptidos de 8 unidades a 12 unidades más cortos dentro de esta secuencia mostraran unión a HLA-A2:01. Se predijo que otro péptido de 13 unidades que contenía la secuencia de aminoácidos IIFWVKRGRKKLL (SEQ ID NO: 12) tenía una afinidad de unión rara con una constante de disociación prevista de aproximadamente 3000 nM. Este ensayo predijo que ninguno de los fragmentos restantes que unían la unión entre los dos dominios mostraría afinidad de unión por HLA-A2:01 (todos tenían una constante de disociación prevista mucho mayor que 5000 nM y, en la mayoría de los casos, mayor que 14.000 nm o 20.000 nM o mayor). En cada uno de los péptidos que se predijo que se uniría a HLA-A2:01, ninguno de los dos residuos que abarcan la unión (VK) se predijo que fuera un residuo de anclaje; más bien, dichos péptidos contenían estos residuos en posiciones no flanqueantes.

[0290] Se predijo que aproximadamente 15 de los péptidos que contenían secuencias derivadas únicamente del dominio transmembrana tenían una constante de disociación para HLA-A2:01 de menos de 5000 nM. Se predijo que dos péptidos que contenían la secuencia solo del dominio coestimulador tenían una constante de disociación para la unión de HLA-A2:01 de menos de 5000 nM. El dominio coestimulador y el dominio transmembrana en la secuencia evaluada se derivan de secuencias humanas endógenas, que generalmente tienen menos probabilidades de ser inmunogénicas para un sujeto humano. Por ejemplo, en el estudio descrito en el Ejemplo 1, no se detectaron respuestas inmunitarias que fueran específicas para secuencias peptídicas únicamente dentro de cualquiera de estos dominios de CAR. En consecuencia, se evaluaron variantes de péptidos que contenían secuencias que abarcaban la región de unión.

[0291] Para generar péptidos variantes que se predijo que tenían afinidades de unión reducidas a HLA-A2:01 y/o inmunogenicidad reducida en un sujeto humano que tenía este alelo HLA, se generó una secuencia variante *in silico*, que contenía mutaciones en la región de unión en comparación con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6. Dado que se predijo que los péptidos que contienen los residuos "VK" que se extienden por la unión (en posiciones que no son de anclaje) exhibirían altas afinidades de unión por HLA-A2:01, se insertaron dos residuos de asparagina en la unión entre la transmembrana CD28 y dominios coestimuladores 4-1BB. La variante contenía la secuencia CYSLLTVVAFIIFWVKNNK~~R~~GRKKLLYIFKQPF (expuesta en SEQ ID NO: 13, la secuencia que flanquea la unión que se generó mediante la inserción de los residuos de asparagina se muestra subrayada). La secuencia variante ejemplar de SEQ ID NO: 13 se evaluó mediante los mismos métodos predictivos. Para evaluar las afinidades de unión predichas para esta secuencia variante, se evaluaron una serie de 154 fragmentos superpuestos de 8-14 aminoácidos de la secuencia establecida en SEQ ID NO: 13 mediante análisis *in silico* como se describe anteriormente, en el que 35 péptidos tenían una secuencia solo en la porción transmembrana, 35 péptidos tenían una secuencia solo en la porción del dominio coestimulador y 84 péptidos contenían una secuencia de la región de unión que contenía aminoácidos que unían los dominios, incluidos uno o ambos residuos de asparagina insertados.

[0292] Los resultados se representan en la FIG. 3. Como se muestra, en general, las afinidades de unión a HLA-A2:01 de los péptidos superpuestos dentro de la región variante que contiene la unión, colectivamente, se redujeron sustancialmente en comparación con la secuencia no variante. En particular, la constante de disociación predicha para la unión a HLA-A2:01 de péptidos en la porción de la región de unión previamente predicha como inmunogénica se redujo sustancialmente. Por ejemplo, las variantes peptídicas IIFWVNNK~~R~~GRKK (SEQ ID NO: 14) e IIFWVNNK~~R~~GRKK (SEQ ID NO: 15), que incluían residuos de asparagina en la región alterada que flanqueaba la unión en comparación con los

péptidos identificados como se establece en SEQ ID NOS: 10 y 11, respectivamente. Se predijo que el documento no exhibiría afinidad de unión detectable con HLA-A2:01. Se predijo que dos péptidos de 14 mer, FIIFWVNNKRGK (SEQ ID NO: 96) e IFWVNNKRGK (SEQ ID NO: 97), exhibían una constante de disociación para unirse a este HLA, lo que indica una afinidad de unión rara, dentro del rango de 1000 nM a 5000 nM. Se predijo que todos los demás péptidos que contenían la secuencia de la región de unión modificada exhibirían una constante de disociación superior a 5000 nM y, en la mayoría de los casos, superior a 14.000 nM o 20.000 nM o mayor, y por lo tanto no se predijo que mostraran afinidad de unión por HLA-A2: 01 por esta evaluación. Además, la modificación de la secuencia de la región de unión no creó ningún péptido nuevo que se predijera que tuviera mayores afinidades de unión por HLA-A2:01 dentro de las regiones del dominio coestimulador o transmembrana.

Ejemplo 5: Administración de células que expresan CAR anti-CD22 a sujetos previamente tratados con CAR anti-CD19

[0293] A seis sujetos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células B CD22+ en recaída/refractaria se les administraron células T autólogas que expresan un receptor de antígeno de compuesto químico anti-CD22 (CAR). El CAR incluía un anticuerpo anti-CD22 scFv humano, un dominio transmembrana CD8alfa, un dominio de señalización intracelular 4-1BB y un dominio de señalización intracelular CD3zeta.

[0294] Todos los sujetos se habían sometido previamente al menos a un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas y habían recibido tratamiento con una de varias terapias de células T CAR dirigidas a CD19. Cinco de los sujetos habían recaído con LLA en la que no se detectó CD19 ("CD19 neg") y un sujeto no respondía a la terapia anterior con CD19 CAR.

[0295] La Tabla 3 resume las características de los pacientes tratados.

Tabla 3: Características de los pacientes						
ID	Edad/Sexo	HCT anterior	Anti-CD19 previo CAR	Recaída negativa de CD19	Densidad del sitio CD22	Carga de enfermedad previa al TCH (% de leucemia en el aspirado)
1	22/V	Y	Y	Y	2084	>95 %
2	20/M	Y (2)	Y	Y	13452	5 %
3	22/V	Y	Y	Y	846	>90 %
4	22/V	Y	Y	N	2589	95 %
5	7/M	Y	Y	Y	2839	32 %
6	17/M	Y	Y	Y	2185	1 %

HCT: trasplante de células hematopoyéticas.

[0296] Antes de la administración de las células, los pacientes se sometieron a leucoaféresis autóloga para recolectar células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células T se aislaron de las PBMC recolectadas mediante enriquecimiento basado en inmunofijación para la expresión de CD3 y se cultivaron en presencia de microesferas anti-CD3-CD28, seguidas de transducción con un vector lentiviral que codifica el CAR anti-CD22. Las células se cultivaron durante 7-10 días. Los sujetos recibieron quimioterapia de inducción con 25 mg/m² de fludarabina los días -4, -3 y -2 y 900 mg/m² de ciclocitosfamida el día -2 (infusión de células el día 0). Cada paciente recibió una dosis inicial de células T CAR de 3 x 10⁵ células T transducidas/peso del receptor (kg) mediante infusión intravenosa. El segundo sujeto inscrito desarrolló diarrea de grado 3, cumpliendo los criterios de toxicidad limitante de la dosis (DLT), lo que condujo a la expansión de la dosis en el primer nivel de dosis para tratar un total de 6 sujetos. No se observaron DLT posteriores con esta dosis. Dos sujetos desarrollaron síndrome de liberación de citoquinas (SCR) de grado 1, un sujeto desarrolló SLC de grado 2 y en dos sujetos no estaba presente el SRC.

[0297] El número de células T CAR en sangre periférica, médula ósea o líquido cefalorraquídeo se determinó en ciertos puntos de tiempo después del tratamiento mediante la incubación de células con CD22-Fc. Para los pacientes en los que se observó expansión, se observó evidencia de expansión de células T CAR en sangre periférica, médula ósea y líquido cefalorraquídeo, comenzando aproximadamente el día 7. La expansión máxima o pico de células T CAR generalmente se observó entre aproximadamente el día 12 y alrededor del día 15 después de la infusión. La Tabla 7 establece el porcentaje máximo o pico de células T CAR anti-CD22 observadas en este período de evaluación como porcentaje de las células T totales en cada muestra para los sujetos tratados. Las respuestas clínicas se evaluaron el día 28 (+/- 4 días) después de la infusión.

[0298] Como se muestra en la Tabla 4, los resultados fueron consistentes con las respuestas que generalmente se correlacionaron con el grado de expansión de las células CART. Para tres sujetos que exhibieron poca o ninguna expansión de células T CAR también mostraron evidencia de progresión de la enfermedad. Otros dos sujetos tenían enfermedad estable, y uno se observó con remisión completa sin ERM. Se detectó la persistencia de CAR citométrica de flujo hasta 47 días después de la infusión en este sujeto, manteniéndose la remisión durante 3 meses después de la infusión. Los resultados demuestran que la terapia de células T con CAR anti-CD22 es segura, factible y clínicamente activa en sujetos que se han sometido (y que no respondieron, por ejemplo, debido a la pérdida de epítopo/antígeno) a

terapia previa con CAR anti-CD19.

Tabla 4: Respuesta al tratamiento						
ID	Máxima expansión CAR (caudal)			SRC	Mejor respuesta	
	PB	Médula	LCR			
1	0	0	n/a	Ninguno	PD	
2	52,3 %	19,5 %	0 %	Gr 1	ERM neg CR	
3	73 %	36 %	32 %	Gr 1	SD	
4	6 %	1 %	0 %	Gr 2	SD	
5	0 %	1,3 %	0 %	Ninguno	PD	
6	1,8 %	2 %	0 %	Ninguno	PD	

PB: sangre periférica; LCR: líquido cefalorraquídeo; SRC: síndrome de liberación de citoquinas; PD: enfermedad progresiva; EMR: enfermedad residual mínima; CR: remisión completa; SD: enfermedad estable.

Ejemplo 6: Comparación del análisis *in silico* y la unión *in vitro* de péptidos derivados de las regiones de unión de un CAR para unirse a HLA de clase II

[0299] Afinidades de unión reales para ciertos alelos de HLA de clase II (DPA1*01:03;DPB1*04: 01, DRA*01:01;DRB1*03:01, DRA*01:01, DRB1*15:01, DRA*01:01;DRB1*11:01, DPA1*01:03;DPB1*04:02, DPA1*01:03;DPB1*03:01, DPA1*01:03;DPB1*01:01, DPA1*02:01;DPB1*01:01, DPA1*02:01;DPB1*04:02, DR*01:01, DRB1*11:04, DRA*01:01, DRB1*01:02 y DPA1*02:01;DPB1*15:01) se evaluaron *in vitro* para detectar secuencias peptídicas de 15 aminoácidos superpuestas ejemplares dentro de una porción de la región que abarca la unión entre las secuencias de CAR derivadas de CD28 y 4-1BB descritas en el Ejemplo 4. Específicamente, la evaluación fue de una serie de péptidos superpuestos de 15 unidades derivados de la secuencia **CYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT** (establecida en SEQ ID NO: 160), que contiene una porción del dominio transmembrana derivado de CD28 y dominio coestimulador derivado de 4-1BB y se extiende por la unión entre los dominios (enlace que une los dos aminoácidos señalados en subrayado). Además, también se evaluó una serie de péptidos 15-mer superpuestos de cada una de las diferentes variantes de esta porción, conteniendo cada variante una mutación o mutaciones en esta región como se describe en el Ejemplo 2.

[0300] Los diversos péptidos 15-mer superpuestos se sintetizaron y su pureza se probó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. A continuación, los péptidos sintéticos se incubaron con moléculas MHC recombinantes para evaluar las propiedades de unión utilizando el Sistema de descubrimiento de epítopos REVEAL como se describe en el Ejemplo 3. Cada péptido se analizó por separado para determinar esta capacidad con respecto a cada uno de los alelos HLA de clase II, normalizados en el grado observado para un control positivo (epítopo de células T conocido para el alelo relevante). Se calculó una puntuación para cada alelo, en la que la unión se normalizó al conjunto de péptidos de control positivo al 100 %. El impacto potencial en la población basado en estas puntuaciones se calculó como la suma de las puntuaciones de los alelos individuales para cada péptido.

[0301] Los resultados se exponen en la FIG. 7. Como se muestra, los resultados demostraron que las modificaciones dentro de la región de unión dieron como resultado una reducción exitosa de la unión de HLA clase II de al menos un péptido dentro de la región.

[0302] Para los péptidos 15-mer superpuestos presentes dentro de la región de unión nativa, los resultados se compararon con los valores de unión previstos (CI50) obtenidos para la unión del mismo complejo péptido:MHC, usando los métodos de predicción *in silico* como se describe en el Ejemplo 2. Dado que el valor máximo de CI50 previsto era de aproximadamente 50.000, los valores de CI50 se transformaron logarítmicamente, se restaron de LOG(50000) y se dividieron por LOG(50000) para obtener una puntuación *in silico* normalizada ((Log(50000)-logCI50)/Log(50000)). Se obtuvieron puntuaciones de inmunogenicidad (ponderadas en base a la frecuencia relativa en la población de los alelos HLA de clase II individuales) para las afinidades de unión normalizadas *in silico* y *reales*. Los resultados se exponen en la FIG. 8. En general, las predicciones de unión *in silico* fueron predictivas y, en algunos casos, sobrepredictivas de los resultados reales de unión *in vitro*.

Ejemplo 7: ingeniería y caracterización de células T transducidas con CAR que tienen regiones de unión modificadas

[0303] Se generaron células T modificadas con CAR por transducción de células T primarias con un vector lentiviral que codifica (1) el receptor de antígeno químérico original (CAR) como se describe en el Ejemplo 1, que contiene un scFv anti-CD 19, un dominio bisagra, la región de unión establecida en SEQ ID NO: 5 (que incluye un dominio transmembrana derivado del CD28 nativo y un dominio de señalización intracelular derivado del 4-1BB nativo) (considerado la región de unión "nativa") y un dominio de señalización intracelular CD3-zeta o (2) una de varias variantes particulares del mismo,

que contienen individualmente una región de unión modificada en la que se introdujeron una o más mutaciones en la región de unión que abarca la unión entre el dominio transmembrana de CD28 y el dominio de señalización coestimulador 4-1BB. Cada una de las variantes de CAR en particular contenía una región de unión modificada que tenía una mutación (con referencia a SEQ ID NO: 5) seleccionada entre: K28Q/R31N/L34S, K28Q/R31N/L34A, R31N/L34S, R31N/L34A, 5 K28Q/ L34A, K28Q/R31S, K28Q/R31N, K28Q/R31A, L34S, L34A, R31S, R31N, R31A, K28S, K28Q, K28L, K28H y K28A.

10 [0304] Se aislaron células T CD4⁺ y CD8⁺ humanas primarias mediante selección basada en inmunoaafinidad a partir de muestras de PBMC humanas obtenidas de donantes sanos. Las células resultantes se estimularon cultivándolas con un reactivo anti-CD3/anti-CD28 antes de la ingeniería con el CAR respectivo. Las células se transdijeron usando un vector lentiviral que contenía una molécula de ácido nucleico que codifica CAR y un ácido nucleico que codifica un EGFR truncado (EGFRt), para usar como marcador sustituto para la transducción, separados por una secuencia que codifica un interruptor de ribosoma T2A. Se usó una transducción simulada como control negativo. Las células transducidas se usaron para análisis de expresión y ensayo de actividad citolítica.

15 *A. Expresión de CAR*

20 [0305] La expresión de CAR en la superficie celular (como se indica a través del marcador sustituto) se evaluó el día 17 después de la transducción con ácido nucleico que codifica el CAR nativo o cada uno de los CAR modificados. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-EGFR para detectar EGFRt como sustituto para verificar la expresión de CAR y se evaluaron mediante citometría de flujo. La expresión de CAR fue similar en las células transducidas para expresar las diversas variantes de CAR que contenían una región de unión modificada, y fue comparable a la expresión de CAR que contenía la región de unión nativa.

25 *B. Actividad citolítica*

30 [0306] Se evaluó la actividad citolítica de células modificadas para expresar los CAR nativos o variantes frente a células diana K562 que expresan el antígeno CD19 (K562-CD19). Los linfocitos T se incubaron con las células diana (K562-CD19) en diversas proporciones efector:objetivo (proporciones CAR:objetivo de 1:1, 2:1 y 4:1) en un pocillo de una placa de cultivo. La actividad lítica de las células T manipuladas se evaluó midiendo el número de células diana positivas para caspasa por pocillo. Los resultados mostraron que, en este estudio, las células T que expresan las diversas variantes de CAR que contienen la región de unión modificada fueron capaces de eliminar las células diana que expresan CD19 de manera específica, en un grado similar al de las células T que expresan la CAR que contiene el "región de unión nativa".

35 **Ejemplo 8: Evaluación de la expresión superficial y la funcionalidad de CAR que tienen regiones de unión modificadas**

40 [0307] Se generaron células T modificadas con CAR por transducción de células T primarias con un ácido nucleico que codifica (1) el receptor de antígeno químérico original (CAR) descrito en Ejemplo 1 que contiene un scFv anti-CD 19, un dominio bisagra, la región de unión nativa expuesta en SEQ ID NO: 5 (que incluye un dominio transmembrana derivado del CD28 nativo y un dominio de señalización intracelular derivado del 4-1BB nativo), o (2) una variante del mismo que contiene una región de unión modificada que tiene una mutación seleccionada entre: K28L, R31H, L34A o L34S con referencia a SEQ ID NO:5. Se evaluaron la expresión de CAR en la superficie celular y las propiedades funcionales de las células T diseñadas con CAR que contenían una región de unión modificada.

45 *A. Expresión superficial*

50 [0308] Para evaluar directamente la expresión superficial de los CAR, las células T modificadas con CAR se tiñeron con un anticuerpo anti-idiotípico específico para el scFv anti-CD 19 contenido en el CAR. Las células manipuladas también se evaluaron para determinar la expresión superficial del marcador sustituto EGFRt utilizando un anticuerpo anti-EGFR. Para detectar la expresión intracelular de los CAR, las células primero se permeabilizaron y luego se tiñeron en condiciones similares usando el anticuerpo anti-idiotípico y el anticuerpo anti-EGFR. La expresión de CAR y el marcador sustituto se analizó mediante citometría de flujo en los subconjuntos CD4⁺ o CD8⁺.

55 [0309] La FIG. 9A y 9B muestran que las variantes de CAR que contienen una región de unión modificada se expresaron en la superficie e intracelularmente, respectivamente, en células T CD4⁺ manipuladas. El nivel de expresión superficial de los CAR variantes fue similar o mayor que la expresión superficial del CAR no modificado que contenía la región de unión nativa. El marcador sustituto, que se cotransdujo con los CAR, se expresó de manera similar en todas las células modificadas.

60 [0310] La intensidad de fluorescencia media (IFM) de la expresión superficial de CAR, determinada usando el anticuerpo antiidiotípico específico de CAR, se cuantificó en células T modificadas genéticamente seleccionadas para células CD4⁺ y CD8⁺. Como se muestra en la FIG. 10, la expresión superficial de los CAR fue similar tanto en las células T CD4⁺ como en las CD8⁺. CAR variantes que contienen una región de unión modificada que tiene las mutaciones L34A y L34S mostró una mayor expresión en la superficie en comparación con el CAR con la región de unión nativa.

65

B. Expresión de citoquinas

[0311] Se evaluó la producción de citoquinas por las células T CAR anti-CD19, que expresan CAR que contienen la región de unión nativa o las diversas regiones de unión modificadas. Las células T manipuladas se cocultivaron con células diana K562 transducidas con CD19 irradiadas (K562-CD19) o células K562 parentales que no expresan el antígeno CD19 en presencia del inhibidor de Golgi. Después de la estimulación, las células se fijaron, permeabilizaron y se evaluaron los niveles de citoquinas de IL-2 e IFN-γ intracelulares mediante citometría de flujo en células CD4+/CAR+ y células CD8+/CAR+.

[0312] Ejemplos de gráficos de citometría de flujo que representan los niveles intracelulares de IL-2 e IFN-γ en células CD4+/CAR+ y Las células CD8+/CAR+ se muestran en la FIG. 11. Como se muestra, un mayor porcentaje de células T CD4+/CAR+ y células T CD8+/CAR+ que expresan las variantes de CAR L34A y L34S mostraron expresión intracelular de IL-2 después de la estimulación con antígeno en comparación con las células modificadas con CAR sin modificar. Un porcentaje mayor de células T CD8+/CAR+ que expresan las variantes de CAR R31H y L34A aumentó la expresión de citoquinas IFN-γ después de la estimulación con antígeno en comparación con las células modificadas con CAR sin modificar. Sin desear limitarse a la teoría, el mayor nivel de expresión de citocinas puede correlacionarse aproximadamente con la mayor expresión superficial observada para las variantes de CAR R31H y L34A.

C. Expansión de células T CAR

[0313] La capacidad de las células para expandirse ex vivo después de estimulaciones repetidas en algunos aspectos puede indicar la capacidad de las células T CAR para persistir (p. ej., después de la activación inicial) y/o es indicativa de la función in vivo (Zhao y otros (2015) Cancer Cell, 28:415-28). Las células T CAR se generaron como se describe anteriormente y se cultivaron con células diana irradiadas (K562-CD19). Las células fueron estimuladas, recolectadas cada 3-4 días y contadas, y reestimuladas con nuevas células objetivo usando las mismas condiciones de cultivo después de restablecer el número de células a la densidad de siembra inicial para cada ronda. Se llevaron a cabo un total de 5 rondas de estimulación durante un período de cultivo de 17 días. Para cada ronda de estimulación, se determinó el número de células.

[0314] Como se muestra en la FIG. 12, se observó un crecimiento inicial comparable de células modificadas con CAR anti-CD19 para células que expresan CAR variantes que contienen una región de unión modificada en comparación con células que expresan CAR con la región de unión nativa. Después del día 7 de reestimulación, el grado de expansión celular disminuyó en las células que expresaban el CAR que contenía la región de unión nativa, mientras que las variantes de CAR exhibieron una expansión continua o similar hasta al menos el día 10 de reestimulación.

SECUENCIAS**[0315]****Tabla 5: Secuencias**

SEQ ID NO	Secuencia	Nota
1	ESKYGPPCPPCP	Bisagra IgG4
2	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAIFIIFWV	Dominio transmembrana CD28
3	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Dominio coestimulador 4-1BB (aminoácidos 214-255 de Q07011,1) Homo sapiens
4	RVKF'SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLVDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGDGLYQGLSTATK DTYDALHMOALPPR	Dominio de señalización intracelular CD3-zeta
5	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAIFIIFWV <u>KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB
6	CYSLLTVVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF	péptido
7	VAFIIFWVKRGRKKLL	péptido
8	AFIIFWVKRGRKKLL	péptido
9	FWVKRGRKKLLYIFK	péptido
10	FIIFWVKRGRKKLL	péptido
11	FIIFWVKRGRKKL	péptido
12	IIFWVKRGRKKL	péptido
13	CYSLLTVVAFIIFWV <u>NN</u> KRGRKKLLYIFKQPF	Región de unión variante
14	IIFWVNNKRGRKKL	péptido variante

(Continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Nota
15	IIFWVNNKGRGRKK	péptido variante
16	VAFIIFWVK	péptido sintético
17	AFIIFWVKR	péptido sintético
18	FIIFWVKRG	péptido sintético
19	IIFWVKRGR	péptido sintético
20	IFWVKRGRKK	péptido sintético
21	FWVKRGRKK	péptido sintético
22	WVKRGRKKL	péptido sintético
23	VAFIIFWVS	Péptido sintético K28S
24	AFIIFWVSR	Péptido sintético K28S
25	FIIFWVSRG	Péptido sintético K28S
26	IIFWVSRGR	Péptido sintético K28S
27	IFWVSRGRK	Péptido sintético K28S
28	FWVSRGRKK	Péptido sintético K28S
29	WVSRGRKKL	Péptido sintético K28S
30	VAFIIFWVL	péptido sintético K28L
31	AFIIFWVLR	Péptido sintético K28L
32	FIIFWVLRG	Péptido sintético K28L
33	IIFWVLRGR	Péptido sintético K28L
34	IFWVLGRRK	Péptido sintético K28L
35	FWVLRGRKK	Péptido sintético K28L
40	WVLRGRKKL	Péptido sintético K28L
37	VAFIIFWVH	Péptido sintético K28H
38	AFIIFWVHR	Péptido sintético K28H
39	FIIFWVHRG	Péptido sintético K28H
40	IIFWVHRGR	Péptido sintético K28H
41	IFWVHRGRK	Péptido sintético K28H
42	FWVHRGRKK	Péptido sintético K28H
43	WVHRGRKKL	Péptido sintético K28H
44	VAFIIFWVA	Péptido sintético K28A
45	AFIIFWVAR	Péptido sintético K28A
46	IIFWVARGR	Péptido sintético K28A
47	IFWVARGRK	Péptido sintético K28A
48	FWVARGRKK	Péptido sintético K28A

(Continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Nota
49	WVARGRKKL	Péptido sintético K28A
50	VAFIIFWVQ	Péptido sintético K28Q
51	AFIIFWVQR	Péptido sintético K28Q
52	FIIFWVQRG	Péptido sintético K28Q
53	IIFWVQRGR	Péptido sintético K28Q
54	IFWVQRGRK	Péptido sintético K28Q
55	FWVQRGRKK	Péptido sintético K28Q
56	WVQRGRKKL	péptido sintético K28Q
57	IIFWVKRGS	Péptido sintético R31S
58	IFWVKRGSK	Péptido sintético R31S
59	FWVKRGSKK	Péptido sintético R31S
60	WVKRGSKKL	Péptido sintético R31S
61	IIFWVKRGL	Péptido sintético R31L
62	IFWVKRGLK	Péptido sintético R31L
63	FWVKRGLKK	Péptido sintético R31L
64	WVKRGLKKL	Péptido sintético R31L
65	IIFWVKRGH	Péptido sintético R31H
66	IFWVKRGHK	Péptido sintético R31H
67	FWVKRGHKK	Péptido sintético R31H
68	WVKRGHKKL	Péptido sintético R31H
69	IIFWVKRGA	Péptido sintético R31A
70	IFWVKRGAK	Péptido sintético R31A
71	FWVKRGAKK	Péptido sintético R31A
72	WVKRGAKKL	Péptido sintético R31A
73	IIFWVKRGN	Péptido sintético R31N
74	IFWVKRGNK	Péptido sintético R31N
75	FWVKRGNKK	Péptido sintético R31N
76	WVKRGNKKL	Péptido sintético R31N
77	IIFWVQRGS	Péptido sintético K28Q/R31S
78	IFWVQRGSK	Péptido sintético K28Q/R31S

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

(Continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Nota
5	79 FWVQRGSKK	Péptido sintético K28Q/R31S
10	80 WVQRGSKKL	Péptido sintético K28Q/R31S
15	81 IIFWVQRGA	Péptido sintético K28Q/R31A
20	82 IFWVQRGAK	Péptido sintético K28Q/R31A
25	83 FWVQRGAKK	Péptido sintético K28Q/R31A
30	84 WVQRGAKKL	Péptido sintético K28Q/R31A
35	85 IIFWVQRGN	Péptido sintético K28Q/R31N
40	86 IFWVQRGNK	Péptido sintético K28Q/R31N
45	87 FWVQRGNKK	Péptido sintético K28Q/R31N
50	88 WVQRGNKKL	Péptido sintético K28Q/R31N
55	89 WVKRGRKKS	Péptido sintético L34S
60	90 WVKRGRKKA	Péptido sintético L34A
	91 WVQRGNKKS	Péptido sintético K28Q/L34S
	92 WVQRGNKKA	Péptido sintético K28Q/L34A
	93 MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDP-CSNC-PAGTFC-CDNNRNQ-ICSPCP PNSFSSAGG-QRTCDICRQC-KGVFRTRKECSSTSNAEC-CDCTPGHCLGAG CSMCE-QDCKQGQEL-TKGK-CDC-CFGTFNDQKRGICRPTNC-SDGK-SVL VNGTKERDV-VCGPS-PADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTS TALLFL-FFLT-LRFSV-VKGRKK-LLYIFKQP-FM-RPV-QTTQEEDG-C-RCF PEEEEGGC-EL	Dominio coestimulador 4-1BB (n.º de acceso Q07011,1) Homo sapiens
	94 MIRLLLALNL-FPSI-QV-TGN-KILV-KQSPML-VAYD-NAVNLSCKY-SYN-LFSR E-FRASL-HKGLD SAVE-VC-VVYGN-Y-SQQL-QVY-SKTGFNC-DGKLG-NES-VTFY-LQ-NLYVN-QTDI YFCK-IEV-MYPP PYLDNE-KSNGT-IIHVKGK-HLCP-SPL-FPGPSK-PFWV-LVVVGGV-LACYSLL VTVAFI-IFWVR SKRSRL-LHSDY-MN-MTPRRPG-PTRK-HY-QPY-APP-RDFA-YRS	Dominio transmembrana CD28 (n.º de acceso P10747) Homo sapiens
	95 MKW-KALFTA-AIL-QAQLP-I-T-EAQSFG-LLDP-KLCY-LDGILFI-YGVIL-TAL FLR-VKF-SRS-ADAP-A-PAY-QQG-QN-QLYNE-LNLGR-RE-EYDV-LDKRRGRDPEMGG KPQR-RK-NP-QEGLY-NEL-QKD-KMA-EAY-SEIG-MKG-ERRRGK-HDGLY-QGLST AT-KD-TY-DAL-HM-QAL-PPR	Cadena zeta CD3 (Acceso No. P20963) Homo sapiens
	96 FIIFWVNNKRG-RK-K	péptido sintético
	97 IFWVNNKRG-RK-KL	péptido sintético
	98 FIIFWVNNKRG-RK-K	péptido sintético
	99 IFWVNNKRG-RK-KL	péptido sintético
	100 VAFIIFWVR	Péptido sintético K28R
	101 AFIIFWVRR	Péptido sintético K28R
	102 FIIFWVARG	Péptido sintético K28A
	103 MF-WV-LVVVGGV-LACYSLL-VT-VAFIIFWV	Dominio transmembrana CD28 (aminoácidos 153-179 de)
		Número de acceso P10747 Homo sapiens

(Continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Nota
5		
104	IEVMYPPPYLDNEKNSNGTIIHVKGKHLCPSPFFPGPSKPFWVLVVVGVLACYSLLTVAFIIFWV	CD28, incluida la transmembrana (aminoácidos 114-179 del número de acceso P10747) Homo sapiens
105	RVKFSRSAEPPAYQQQNQLYNELNLRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKDMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR	CD3 zeta Homo sapiens
15		
106	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCTGCCCT	espaciador (IgG4bisagra) (nt) homo sapiens
20		
107	ESKYGPPCPGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Bisagra-CH3 espaciador Homo sapiens
25		
108	ESKYGPPCPGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	Bisagra-CH2-CH3 espaciador Homo sapiens
30		
109	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGLAKATTAPATTRNTGRGEEKKEKEKEEEQEERETKTPCPSHTQPLGVYLLTPAVQDILWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHTEVAGKVTGVEEGLLERHSNGSQSHSRLTLPRSLWVAGTSVTCNLHPSLPPQRMLAREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH	IgD-bisagra-Fc Homo sapiens
35		
110	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A artificial
40		
111	MLLLVTSLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTIKIIISNRGENSKATGQVCHALCSPCGCGPEPRDCVSCRNVRSGRECVDKCNLLEGEPEFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDCNIQCAHYIDGPHCVKTCAGVMENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLECCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLVVVALG1GLFM	tEGFR artificial
45		
112	RSKRSRLLHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	Dominio citoplasmático CD28 (aminoácidos 180-220 de P10747) Homo sapiens
50		
113	RSKRSRGGHSDYMNMTPRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	Variante del dominio citoplasmático CD28 (LL a GG) Homo sapiens
55		
114	FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFWV <u>ARGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28A
60		
115	FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFWV <u>HRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28H
65		
116	FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFWV <u>LRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28L
117	FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFWV <u>QGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28Q
118	FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFWV <u>SRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28S
119	FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFWV <u>KRGAKKLLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB R31A
120	FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFWV <u>KRGHKKLLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB R31H

(Continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Nota
5	121 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>KRGLKKLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB variante R31L
10	122 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>KRGNKKLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB R31N
15	123 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>KRGRKKALYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB L34A
20	124 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>KRGRKKSLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB L34S
25	125 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>ORGAKKLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28Q/R31A
30	126 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>ORGNKKLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28Q/R31N
35	127 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>ORGSKKLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28Q/R31S
40	128 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>ORGRKKALYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28Q/L34A
45	129 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>ORGRKKSLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28Q/L34S
50	130 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>KRGNKKALYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB R31N/L34A
55	131 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>KRGNKKSLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB R31N/L34S
60	132 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>ORGNKKALYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28Q/R31N/L34A
65	133 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>ORGNKKSLYIFKQPFMRPVQTT</u> QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Variante CD28-4-1BB K28Q/R31N/L34S
	134 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>NNKRGRKKLYIFKQPFMRPVQ</u> TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB con región de unión variante con inserción NN
	135 FWVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFW <u>VKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ</u> TOEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB
	136 IEVMPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGV LACYSLLTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL	CD28-4-1BB
	137 SLLTVAFIIFW <u>VKRGRKKLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB
	138 SLLTVAFIIFW <u>VARGRKKLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14A
	139 SLLTVAFIIFW <u>VHRGRKKLLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14H
	140 SLLTVAFIIFW <u>VLRGRKKLLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14L
	141 SLLTVAFIIFW <u>VQRGRKKLLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14Q
	142 SLLTVAFIIFW <u>VSRGRKKLLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14S
	143 SLLTVAFIIFW <u>VKRGAKKLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante R17A

(Continuación)

SEQ ID NO	Secuencia	Nota
5	144 SLLVTVAIFIIFWV <u>KRGHKKLLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante R17H
10	145 SLLVTVAIFIIFWV <u>KRGLKKLLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante R17L
15	146 SLLVTVAIFIIFWV <u>KRGNKKLLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante R17N
20	147 SLLTVVAFIIFWV <u>KRGRKKALYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante L20A
25	148 SLLTVVAFIIFWV <u>KRGRKKSLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante L20S
30	149 SLLTVVAFIIFWV <u>QRGAKKLLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14Q/R17A
35	150 SLLTVVAFIIFWV <u>QRGNKKLLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14Q/R17N
40	151 SLLTVVAFIIFWV <u>QRGSKKLLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14Q/R17S
45	152 SLLTVVAFIIFWV <u>QRGRKKALYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14Q/L20A
50	153 SLLTVVAFIIFWV <u>QRGRKKSLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14Q/L20S
55	154 SLLTVVAFIIFWV <u>KRGNKKALYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante R17N/L20A
60	155 SLLTVVAFIIFWV <u>KRGNKKSLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante R17N/L20S
65	156 SLLTVVAFIIFWV <u>QRGNKKALYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14Q/R17N/L20A
	157 SLLTVVAFIIFWV <u>QRGNKKSLYIFKQ</u>	Región de unión CD28-4-1BB Variante K14Q/R17N/L20S
	158 G A A T C T A A G T A C G G A C C G C C C T G C C C C C C T T G C C C T RVKF'SRASADAPAYQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRGRDPPEMGKPR RRKNPQEGLYNELQDKDMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQLPPR	espaciador (bisagra IgG4) (nucleótido) homo sapiens
	159	CD3 Zeta
	160 CYSLLTVVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT	péptido
	161 CYSLLTVVAFIIFWV	péptido sintético
	162 LLVTVAIFIIFWVKRG	péptido sintético
	163 TVAFIIFWVKRGRKK	péptido sintético
	164 FIIFWVKRGRKKLLY	péptido sintético
	165 FWVKRGRKKLLYIFK	péptido sintético
	166 KRGRKKLLYIFKQPF	péptido sintético
	167 RKKLLYIFKQPFMRP	péptido sintético
	168 LLYIFKQPFMRPVQT	péptido sintético
	169 TVAFIIFWVKRGHKK	Péptido sintético R31H
	170 FIIFWVKRGHKLLY	Péptido sintético R31H
	171 FWVKRGHKLLYIFK	Péptido sintético R31H
	172 KRGHKKLLYIFKQPF	Péptido sintético R31H
	173 HKKLLYIFKQPFMRP	Péptido sintético R31H
	174 TVAFIIFWVKRGNKK	Péptido sintético R31N
	175 FIIFWVKRGNKKLLY	Péptido sintético R31N
	176 FWVKRGNKKLLYIFK	Péptido sintético R31N
	177 KRGNKKLLYIFKQPF	Péptido sintético R31N
	178 NKKLLYIFKQPFMRP	Péptido sintético R31N
	179 FIIFWVKRGRKKALY	Péptido sintético L34A
	180 FWVKRGRKKALYIFK	Péptido sintético L34A
	181 KRGRKKALYIFKQPF	Péptido sintético L34A
	182 RKKALYIFKQPFMRP FWVLVVGGVLACYSLLTVAFIIFWVKRGSKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	Péptido sintético L34A
	183	Variante CD28-4-1BB R31S
	184 SLLTVVAFIIFWVKRGSKKLLYIFKQ	Región de unión CD28-4-1BB Variante R31S

REIVINDICACIONES

1. Un receptor quimérico variante que comprende una región de unión modificada que tiene una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos en comparación con una región de unión de un receptor quimérico de referencia, en el que:
- 5 el receptor quimérico de referencia comprende un dominio transmembrana CD28 y un dominio de señalización 4-1BB, unido en una secuencia contigua en una unión, donde la región de unión del receptor quimérico de referencia comprende hasta 15 aminoácidos contiguos directamente C-terminal de la unión y/o hasta 15 aminoácidos contiguos directamente N-terminal del empalme; y
- 10 un fragmento peptídico que tiene la secuencia de una porción de 8-15 aminoácidos de la región de unión modificada y que tiene una afinidad de unión por una molécula de antígeno leucocitario humano (HLA) que es menor que la afinidad de unión, por la misma molécula HLA, de un fragmento de péptido que tiene la secuencia de la porción correspondiente de la región de unión del receptor quimérico de referencia, en el que: la una o más modificaciones comprenden uno o más reemplazos de aminoácidos y los reemplazos de aminoácidos están en uno o más residuos correspondientes a un resto seleccionado de 28, 31 y 34, en el que el(s) reemplazo(s) de aminoácido corresponde(n) o es un reemplazo seleccionado entre K28A, K28H, K28L, K28Q, K28S, R31A, R31H, R31L, R31N, R31S, L34A y L34S, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO: 5, y en donde:
- 15 el receptor quimérico variante comprende una región de unión modificada que comprende menos del 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 137 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:137 y comprende las modificaciones; y/o
- 20 la variante del receptor quimérico comprende una secuencia que comprende menos del 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:5 y comprende las modificaciones.
- 25
2. Un receptor quimérico variante que comprende una región de unión modificada que tiene una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos, en el que el receptor quimérico variante comprende desde su terminal N a C en orden: un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana CD28, un dominio intracelular 4-1BB dominio coestimulador y un dominio de señalización citoplásmica activador, donde el dominio transmembrana y el dominio coestimulador intracelular se unen en secuencia contigua en una unión para formar la región de unión modificada, donde
- 30 la una o más modificaciones comprenden uno o más reemplazos de aminoácidos y el aminoácido el(s) reemplazo(s) corresponde(n) o es un reemplazo seleccionado entre K28A, K28H, K28L, K28Q, K28S, R31A, R31H, R31L, R31N, R31S, L34A y L34S, con referencia a la numeración establecida en SEQ ID NO:5, en el que el receptor quimérico variante comprende una región de unión modificada que comprende menos del 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 137 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:137 y comprende las modificaciones; y/o
- 35 el receptor quimérico variante comprende una secuencia que comprende menos del 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 pero más del 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o 96 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO:5 y comprende las modificaciones.
- 40
3. La variante del receptor quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde los reemplazos de aminoácidos son o corresponden a reemplazos de aminoácidos seleccionados entre K28Q/R31A, K28Q/R31N, K28Q/R31S, K28Q/L34A, K28Q/L34S, R31N/L34A, R31N/L34S, K28Q/R31N/L34A y K28Q/R31N/L34S.
- 45
4. El receptor quimérico variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el receptor quimérico variante comprende una región de unión modificada seleccionada entre:
- 50 i) la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de SEQ ID NOS: 138-157 y 184; y
ii) una variante funcional de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 138-157 y 184 y que comprende la(s) modificación(es).
- 55
5. El receptor quimérico variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el receptor quimérico variante comprende:
- 60 i) la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOS: 114-134 y 183; o
ii) una variante funcional de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 114-134 y 183 y que comprende la(s) modificación(es).
- 65
6. El receptor quimérico variante de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5 que muestra una inmunogenicidad reducida en comparación con el receptor quimérico de referencia tras la administración a un sujeto humano.

7. El receptor quimérico variante de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6, en el que:
- 5 el receptor quimérico de referencia comprende además un dominio de señalización citoplasmático activador; y/o el receptor quimérico variante comprende además un dominio citoplasmático activador; en el que el dominio citoplasmático activador comprende un componente del receptor de células T (TCR) y/o comprende un motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (ITAM), opcionalmente en el que el dominio de señalización citoplasmático activador es o comprende un dominio de señalización citoplasmático de una cadena zeta de un CD3-zeta cadena (CD3 ζ) o una variante funcional o porción de señalización de la misma.
- 10 8. El receptor quimérico variante de la reivindicación 2, en el que el dominio citoplasmático activador comprende un componente de receptor de células T (TCR) y/o comprende un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM), opcionalmente en el que el dominio de señalización citoplasmático activador es o comprende un dominio de señalización citoplasmático de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3 ζ) o una variante funcional o porción de señalización del mismo.
- 15 9. La variante del receptor quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-7, en la que:
- 20 el receptor quimérico de referencia comprende desde su terminal N a C en orden: un dominio de unión a ligando extracelular, el primer dominio que es el dominio transmembrana, el segundo dominio que es el dominio coestimulador intracelular y una señalización citoplasmática activadora dominio; y/o el receptor quimérico variante comprende desde su terminal N a C en orden: un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana, un dominio coestimulador intracelular y un dominio de señalización citoplasmático activador, donde el dominio transmembrana y el dominio coestimulador intracelular se unen en secuencia contigua en una unión para formar la región de unión modificada.
- 25
10. Una molécula de ácido nucleico que codifica la variante del receptor quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 30 11. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Una célula diseñada que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10 o el vector de la reivindicación 11 o que expresa el receptor quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde opcionalmente la célula es una célula T.
- 35 13. Una composición que comprende las células manipuladas de la reivindicación 12, y opcionalmente un tampón farmacéuticamente aceptable.
14. La composición de la reivindicación 13 para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o condición.
- 40 15. La composición para uso de la reivindicación 14, en la que la enfermedad o afección es un cáncer, un tumor, una enfermedad o trastorno autoinmune o una enfermedad infecciosa.

FIG. 1

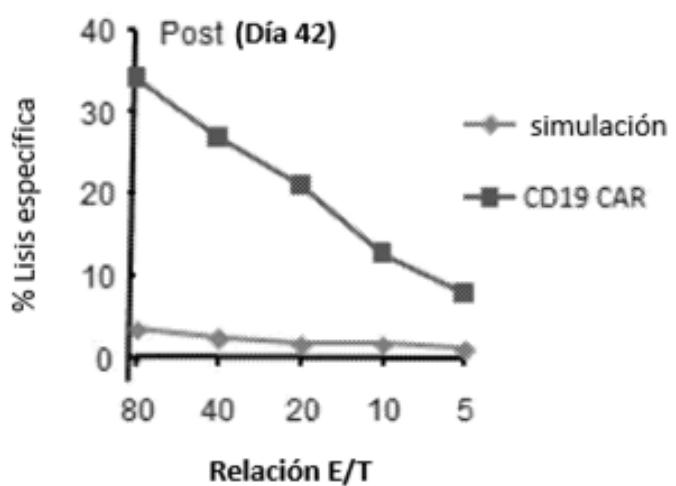
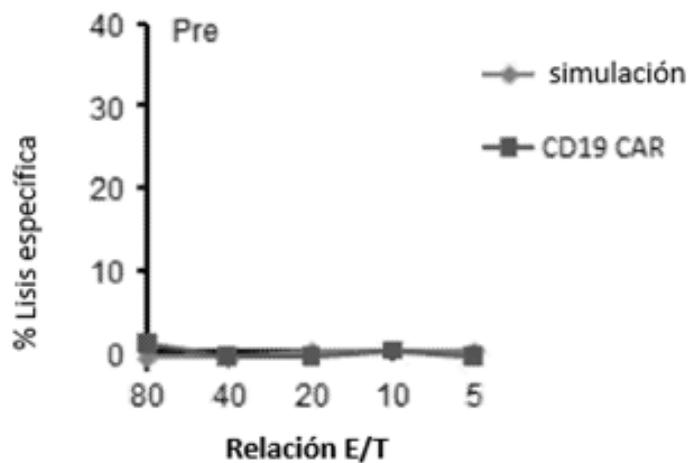


FIG. 2

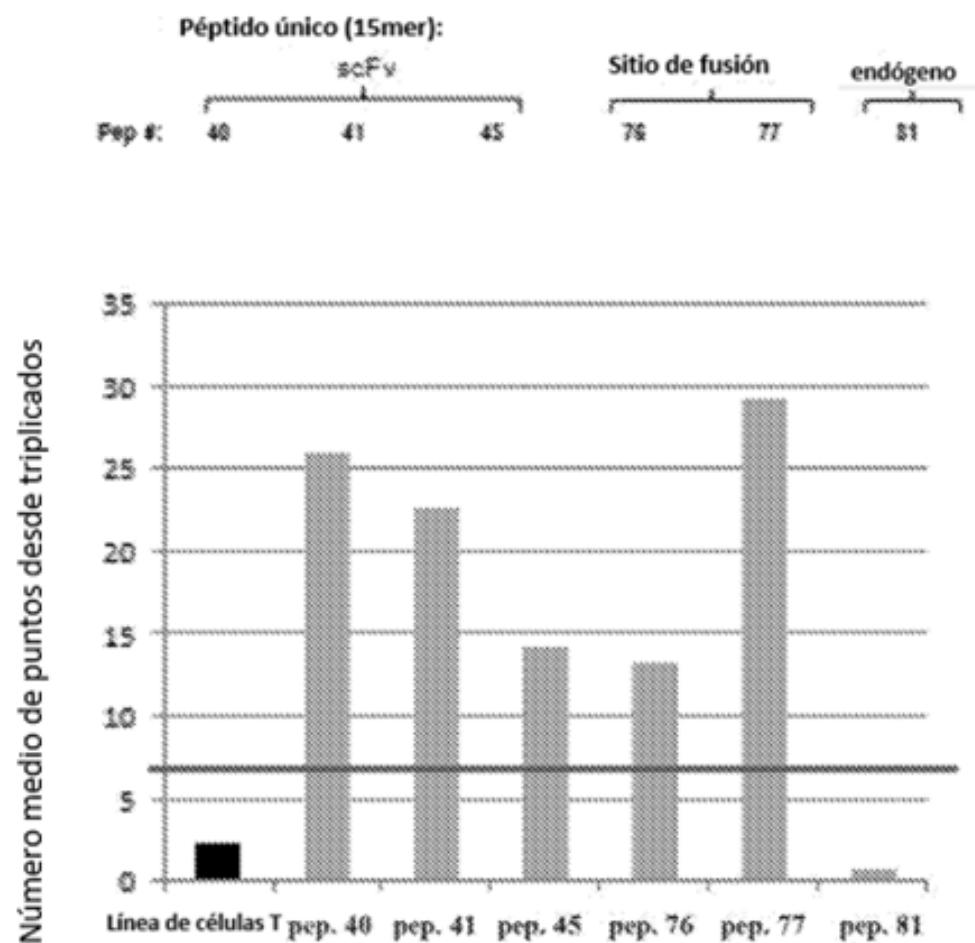


FIG. 3

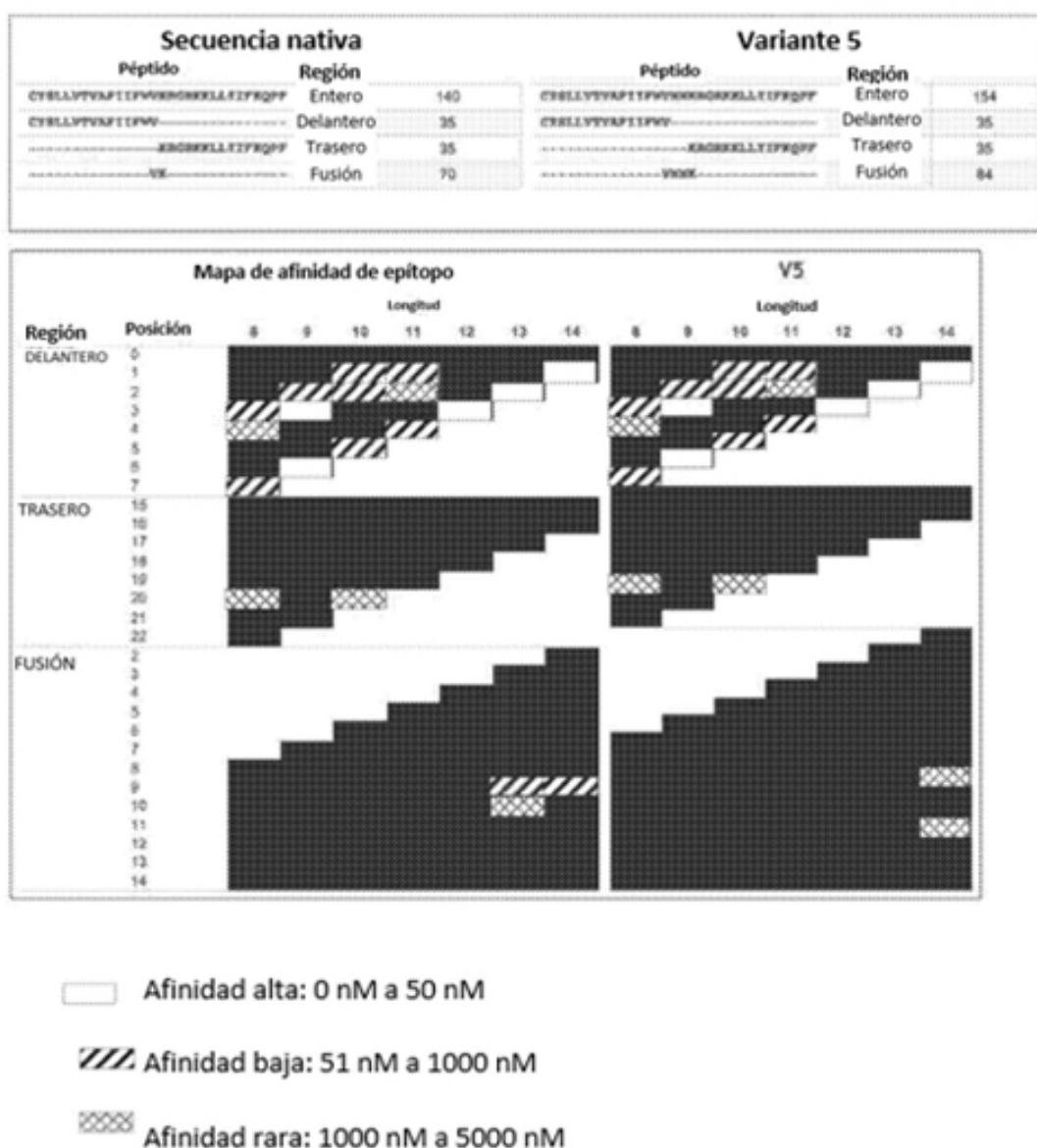


FIG. 4A

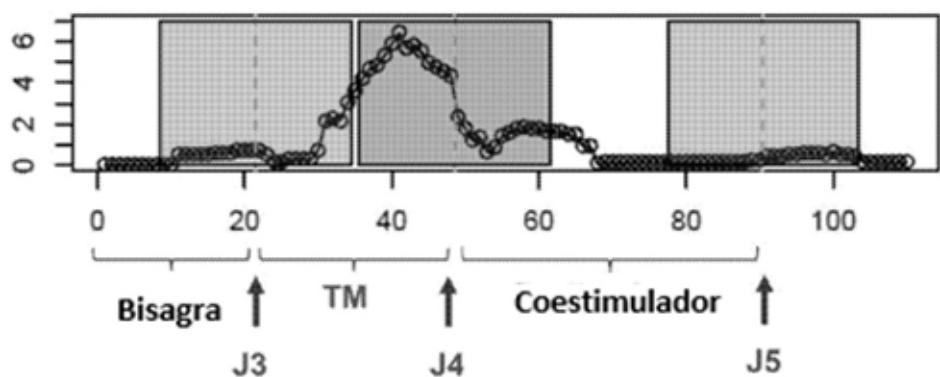


FIG. 4B

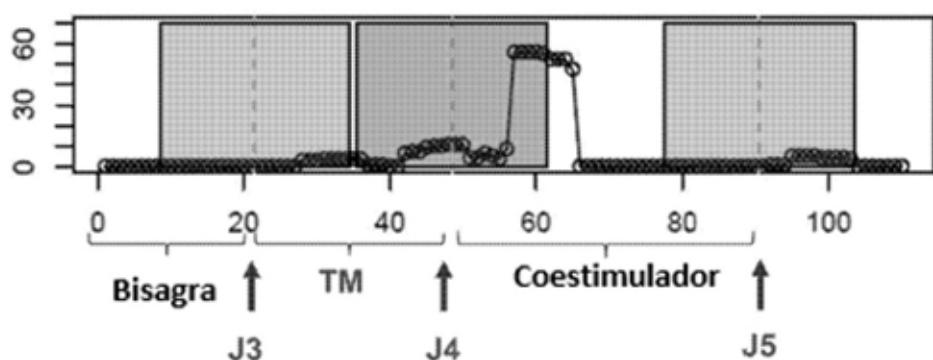


FIG. 5

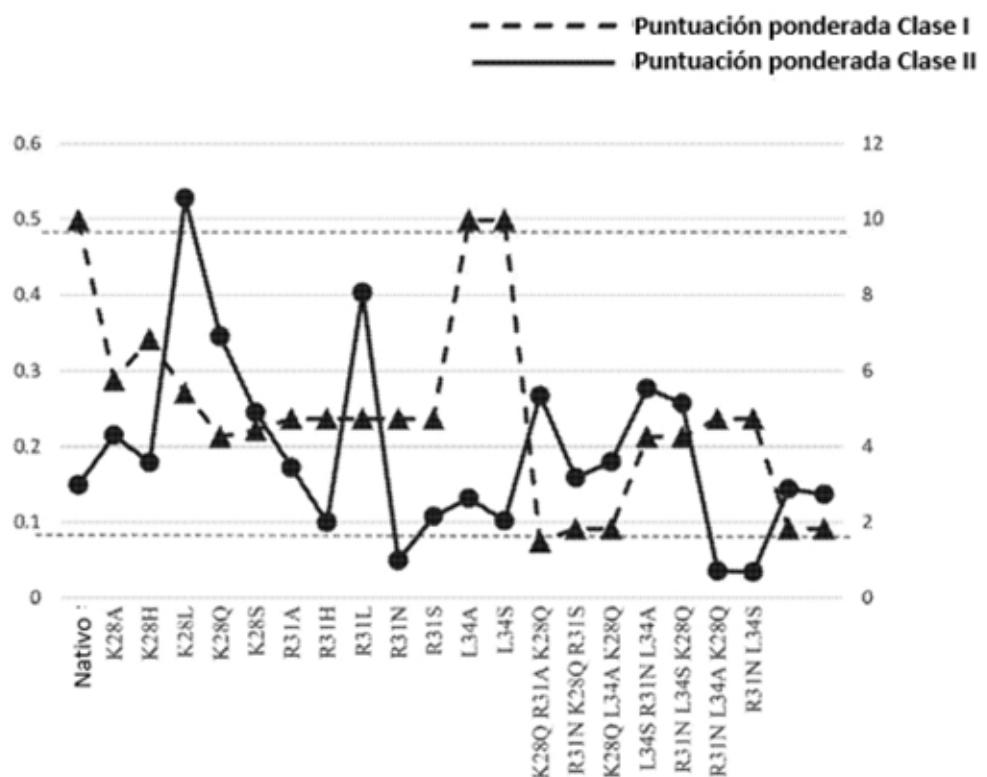
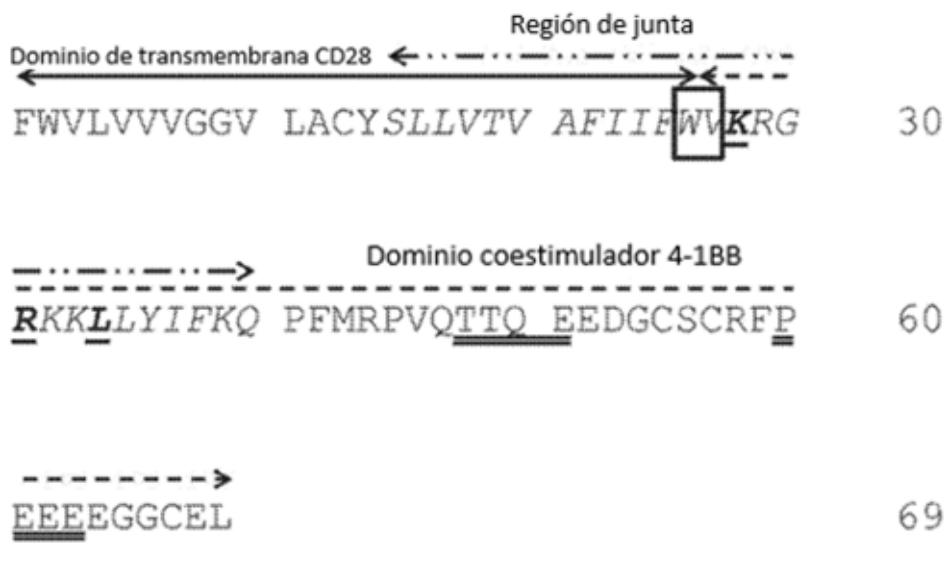


FIG. 6



SEQ ID NO: 5

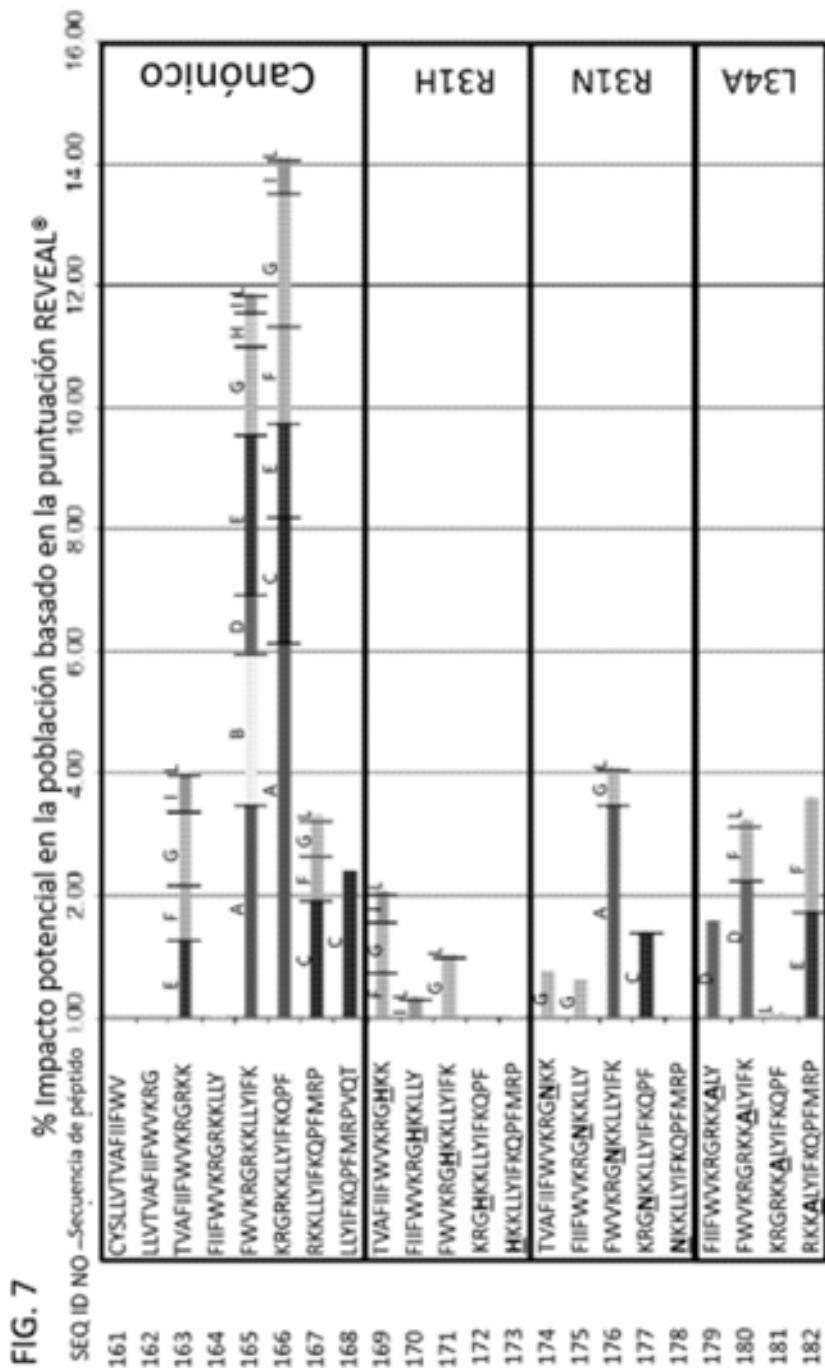


FIG. 8

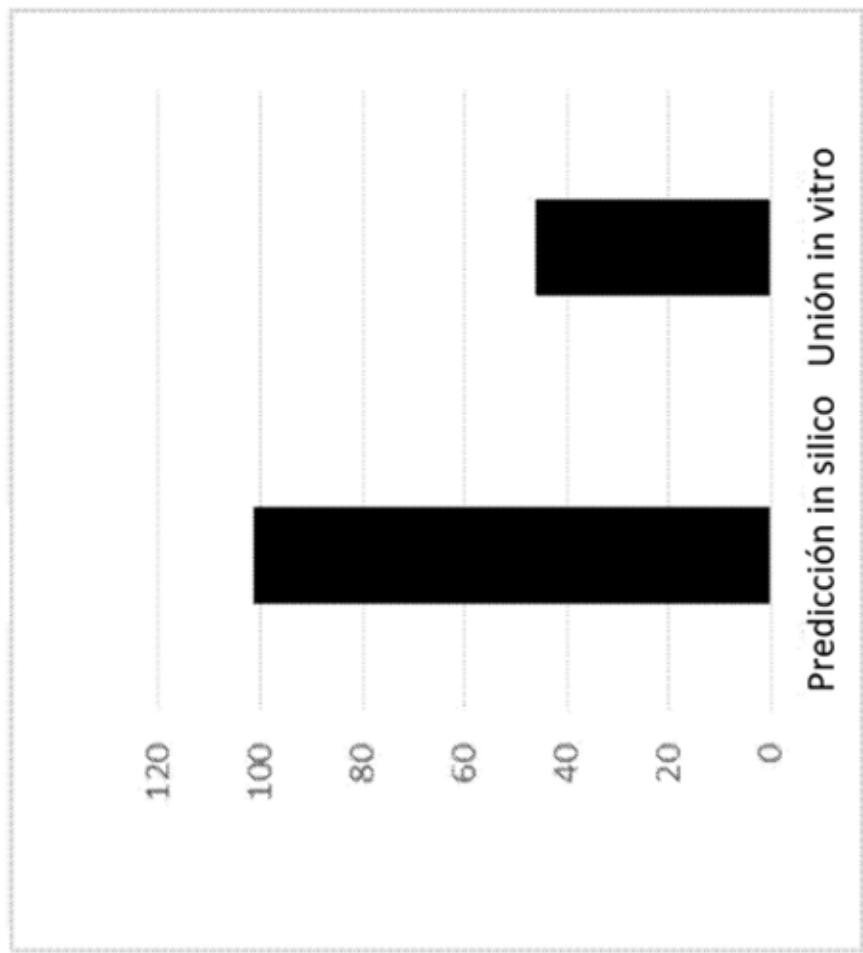
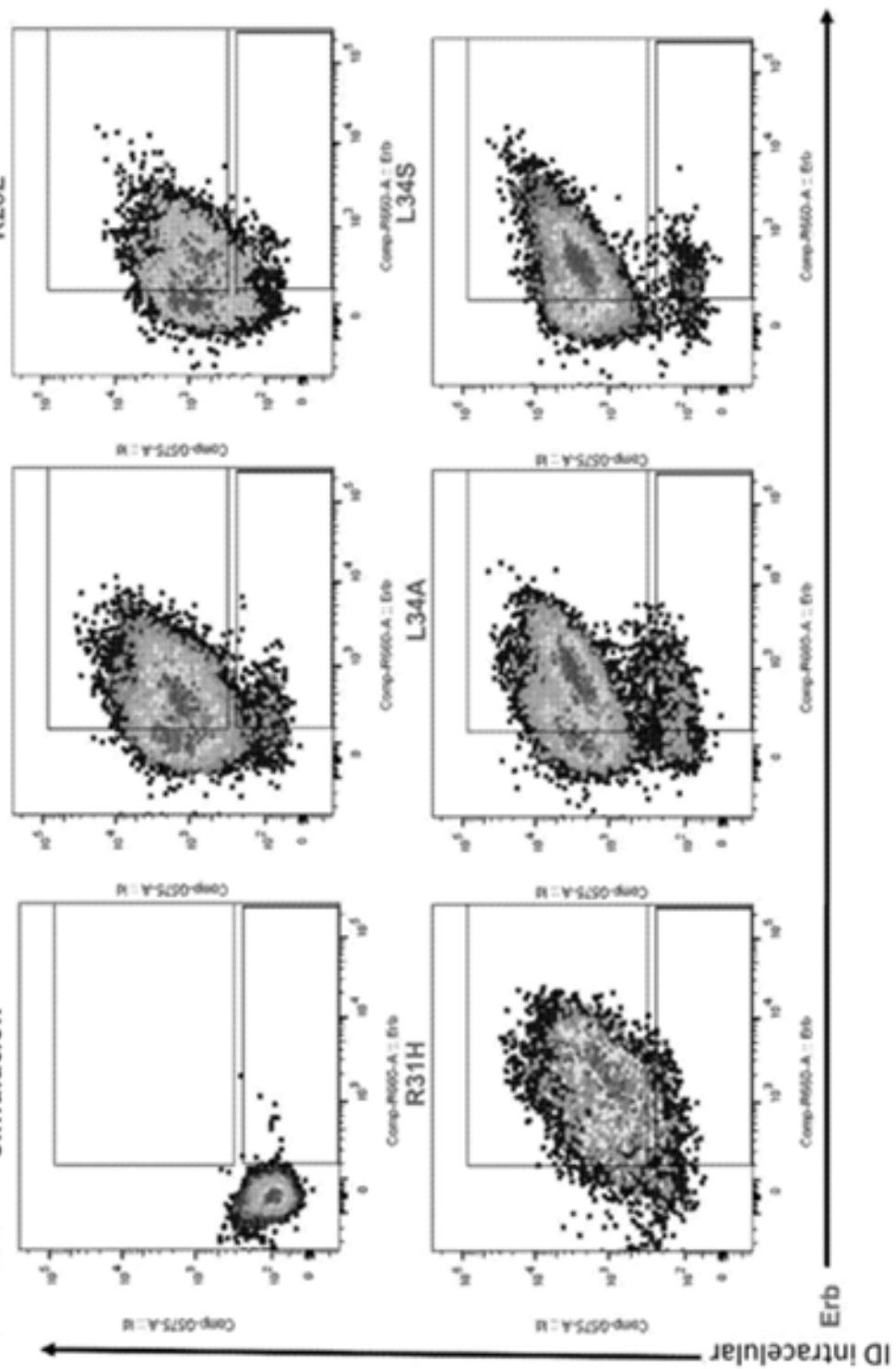
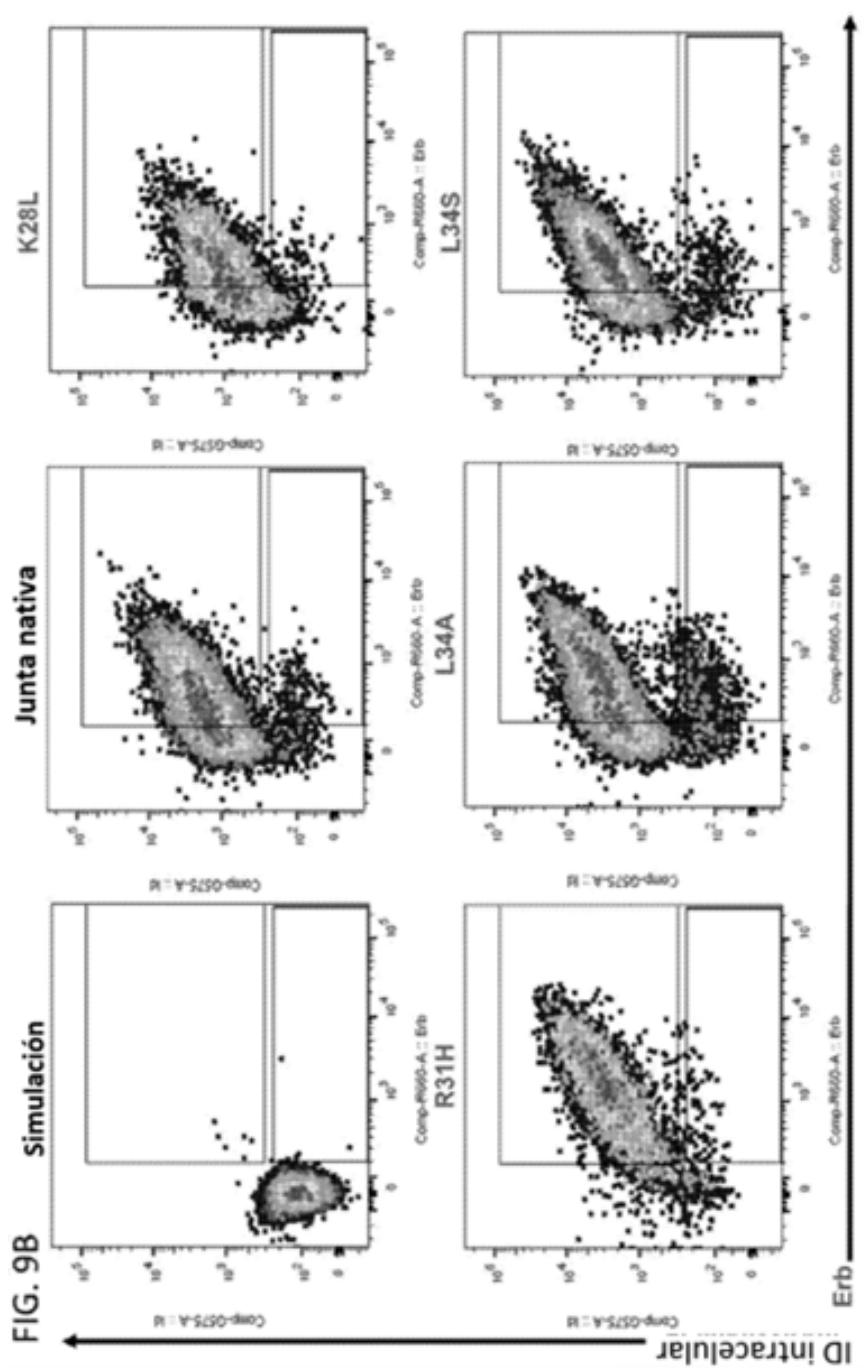


FIG. 9A Simulación Junta nativa





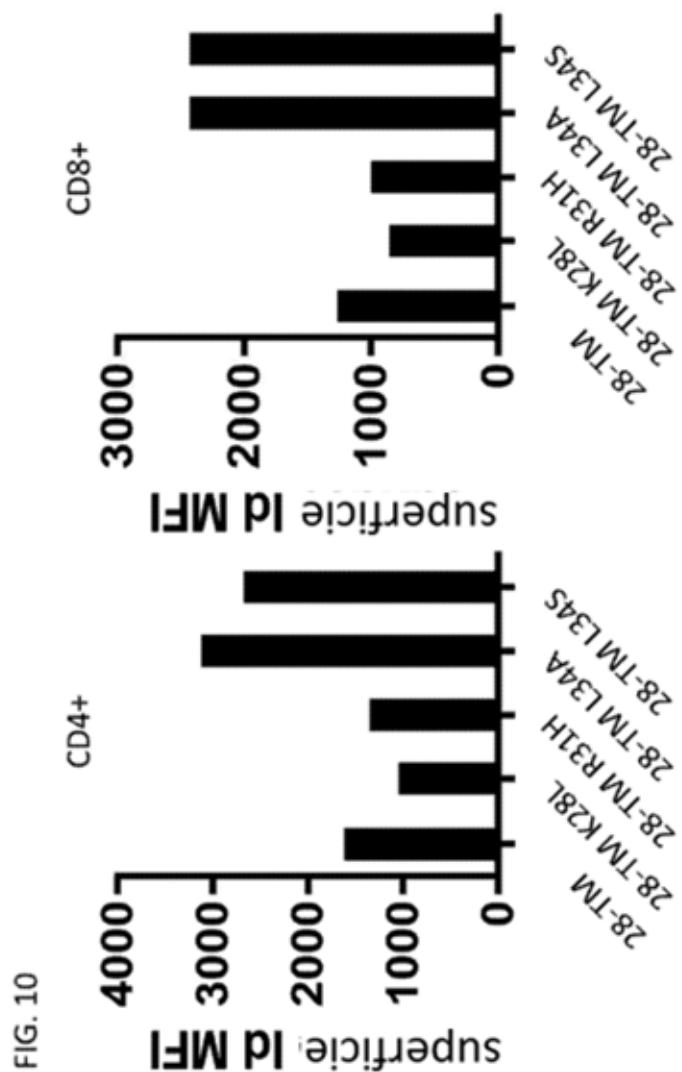
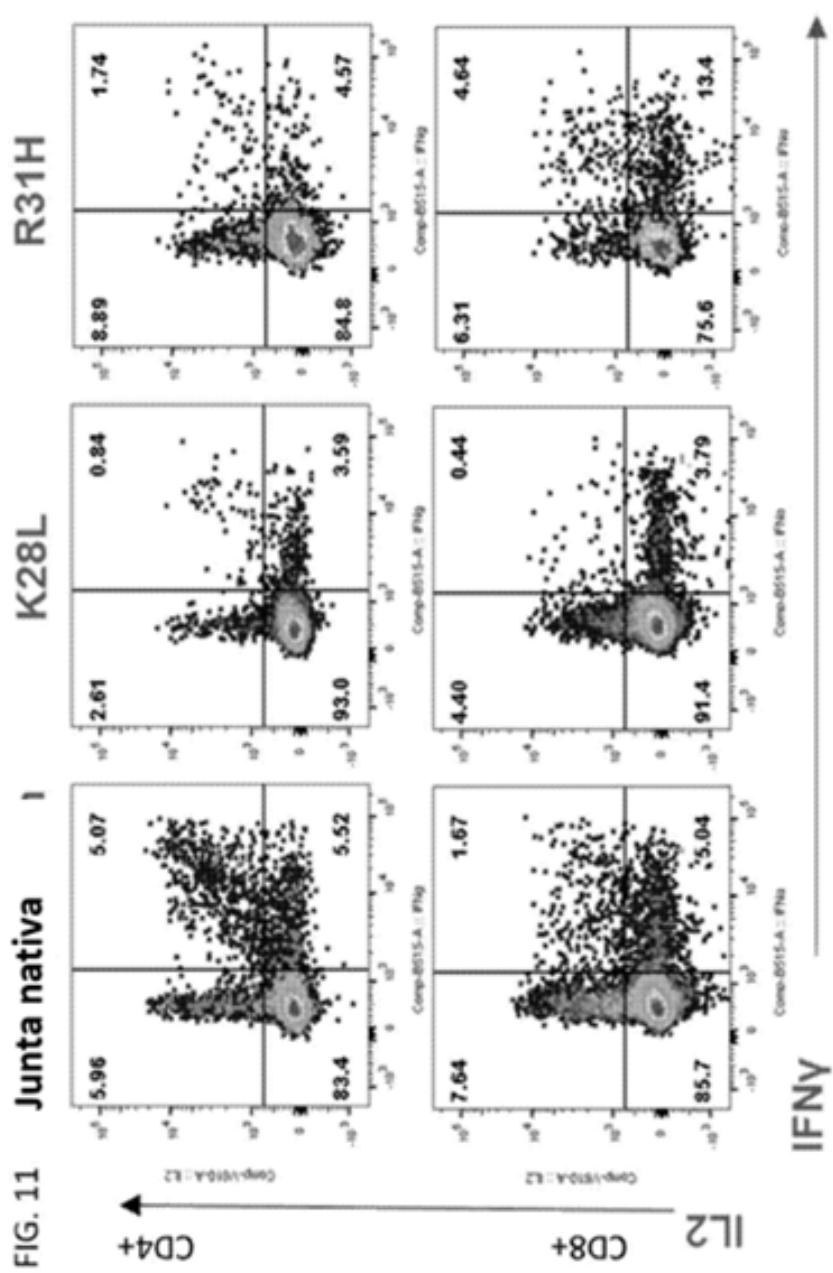


FIG. 10



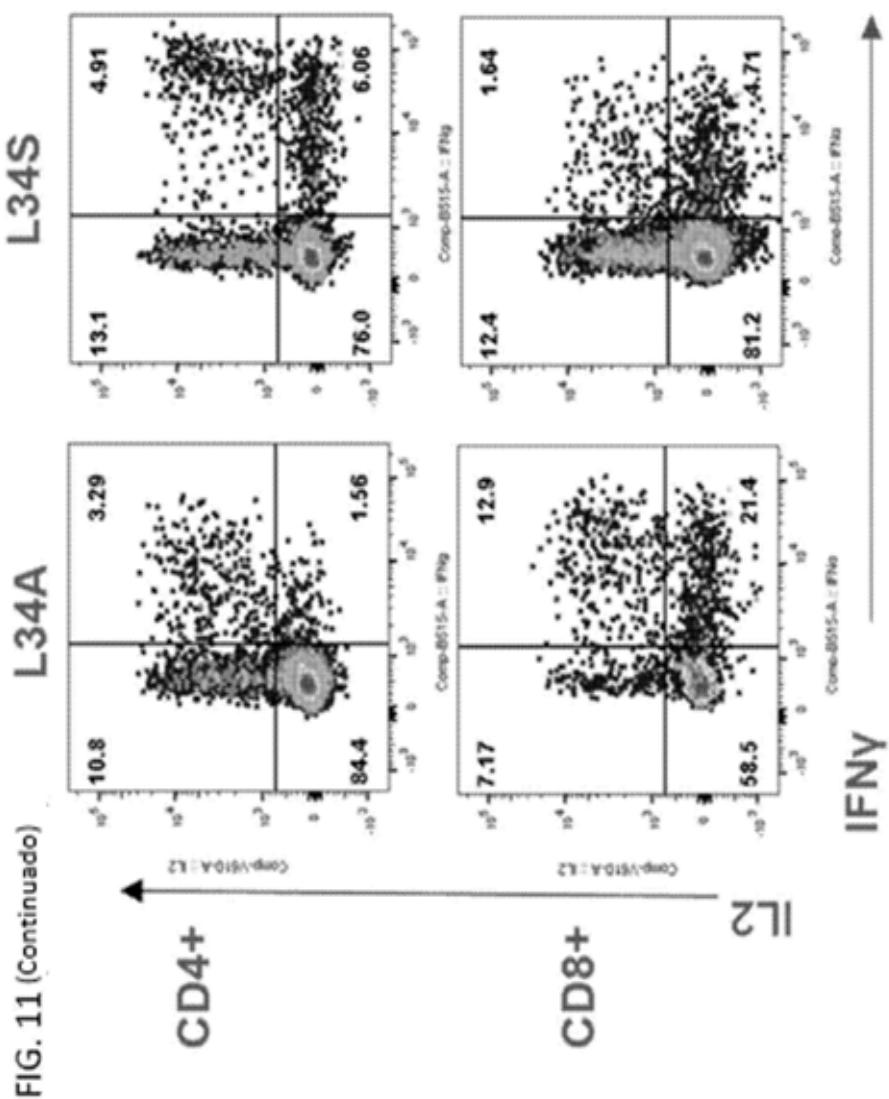


FIG. 12

