

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 981 274**

(51) Int. Cl.:
C12N 5/0783 (2010.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2017 PCT/US2017/028693**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2017 WO17184901**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2017 E 17724147 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024 EP 3445847**

(54) Título: **Proteínas de fusión de IL2R inmunomoduladoras y usos de las mismas**

(30) Prioridad:

20.04.2016 US 201662325428 P

(73) Titular/es:

**FRED HUTCHINSON CANCER CENTER (100.0%)
1100 Fairview Avenue North
Seattle, WA 98109, US**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.10.2024

(72) Inventor/es:

**SCHMITT, THOMAS, M.;
GREENBERG, PHILIP, D. y
STROMNES, INGUNN, M.**

(74) Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 981 274 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

Proteínas de fusión de IL2R inmunomoduladoras y usos de las mismas

5 **Antecedentes**

Las inmunoterapias basadas en células T comenzaron a desarrollarse cuando se encontraron células T reactivas a tumores entre una población de linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) (Clark *et al.*, Cancer Res. 29:705, 1969). Una estrategia, conocida como transferencia adoptiva de células T, en algunos contextos, implica el aislamiento de linfocitos infiltrantes tumorales preseleccionados por su reactividad a tumores, la expansión clonal de las células T reactivas a tumores inducidas por anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2 y finalmente la infusión de la población de células expandidas de vuelta al paciente que porta el tumor (junto con quimioterapia y administración repetitiva de IL-2) (Dudley *et al.*, Science 298:850, 2002). Esta forma de terapia adoptiva de células T con linfocitos infiltrantes tumorales puede ser técnicamente engorrosa y conduce a la remisión completa únicamente en una pequeña fracción de pacientes con melanoma y rara vez es eficaz en otros cánceres (Besser *et al.*, Clin. Cancer Res. 16:2646, 2010).

El aislamiento de clones de células T reactivas a tumores condujo al desarrollo de otro enfoque inmunoterapico, la generación de receptores de células T (TCR) recombinantes específicos de antígenos particulares, que pueden introducirse en las células T, por ejemplo, usando un sistema de administración de vectores, para conferir especificidad por una diana deseada tal como un péptido asociado a tumor presentado por una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) expresada en una célula tumoral (conocida como molécula de antígeno leucocitario humano (HLA) en humanos). Otro enfoque introduce un receptor sintético, denominado receptor de antígeno químérico (CAR), que generalmente contiene un dominio de unión a antígeno que, por ejemplo, en el contexto de una terapia antitumoral, puede unirse a un antígeno asociado a o específico de tumor, unido a uno o más componentes intracelulares que comprenden dominios efectores, tales como un dominio de señalización primaria tal como un dominio de señalización de TCR o, en algunos contextos, dominios de señalización coestimuladores. A diferencia de la administración de TIL, el procedimiento básico para la inmunoterapia de células T con CAR o TCR diseñadas por ingeniería generalmente consiste en modificar genéticamente las células T humanas con un transgén que codifica para un resto que selecciona como diana el tumor, expandir *ex vivo* las células T recombinantes y transfundir las células T recombinantes expandidas de vuelta a los pacientes.

Se ha demostrado que la terapia adoptiva de células T que usa células T que expresan TCR recombinantes tiene un beneficio clínico prometedor, especialmente en determinados cánceres de células B. Sin embargo, la activación eficaz de células T a menudo requiere o se potencia por una señal coestimuladora concurrente (Chen y Flies, Nat. Rev. Immunol. 13: 227-242, 2013). En el microambiente tumoral, las moléculas coestimuladoras generalmente están reguladas por disminución. Como resultado, normalmente se requiere un estímulo exógeno a través de IL-2 para las células T que expresan TCR recombinantes específicos de antígenos cancerígenos.

40 La activación de células T se inicia cuando el TCR se acopla a un péptido específico presentado en CMH en una célula presentadora de antígeno (APC) (Rossy *et al.*, Frontiers in Immunol. 3:1, 2012). Múltiples citocinas, incluyendo IL-2, pueden afectar a la proliferación y a la supervivencia de las células T. La magnitud de la respuesta de las células T está regulada en parte por señales suministradas a las células T a través de receptores de citocinas. El complejo receptor de IL-2 (IL-2R) es un heterotímero que se compone de una cadena α singular (CD25), una cadena β compartida con el receptor de IL-15 y una cadena γ compartida con los receptores de IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, todos los cuales también pueden suministrar señales proliferativas (Nelson y Willerford, Adv. Immunol. 70:1, 1998).

50 Las células T CD8 $^{+}$ generalmente pierden la capacidad de producir IL-2 después de su diferenciación en células T efectoras (CTL) (Aruga *et al.*, J. Leukocyte Biol. 61:507, 1997). Las células T CD8 $^{+}$ efectoras diferenciadas también conservan la capacidad de secretar muchas citocinas, incluyendo el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Aruga *et al.*, 1997), pero no expresan el receptor de GM-CSF. La administración de IL-2 exógena por vía sistémica puede usarse para prolongar la longevidad de las CTL *in vivo* (Cheever y Chen, Immuno. Rev. 157:177, 1997), pero el tratamiento con IL-2 se ha asociado con una toxicidad grave (Dagleish, Gene Ther. 1:83, 1994).

60 Evans *et al.*, Human Gene Therapy 10:1941-1951 (1999), así como el documento WO9422914, describen la transfección de CTL humanas con un receptor químérico de GM-CSF/IL2, dando como resultado un bucle de crecimiento autocriño.

Sigue existiendo la necesidad en el campo de la inmunoterapia de una mayor señalización y eficacia por medio de IL-2R en la respuesta de las células T CD8 $^{+}$ *in vivo*. Las realizaciones divulgadas en el presente documento abordan estas necesidades y proporcionan otras ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una célula huésped, que comprende una proteína de fusión y una proteína de unión a antígeno, en la que la proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción de dominio de unión a citocina del mismo y un componente intracelular que comprende una porción intracelular de IL-2R, un dominio de señalización intracelular o una porción de dominio de señalización intracelular del mismo, y en la que la proteína de unión a antígeno es un receptor de células T (TCR), un receptor de antígeno quimérico (CAR) o ambos, en la que el TCR es exógeno con respecto a la célula huésped; y en la que la proteína de unión a antígeno es específica de un antígeno específico de cáncer.

La presente invención también proporciona una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión y la proteína de unión a antígeno divulgadas en el párrafo anterior.

La presente invención también proporciona una composición que comprende la célula huésped de la presente invención y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona la célula huésped de la presente invención o la composición de la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

En las reivindicaciones se proporcionan aspectos adicionales de la invención.

Debe interpretarse que cualquier divulgación relacionada con un método de tratamiento en la presente patente hace referencia a la célula huésped de la presente invención o a la composición de la presente invención para su uso en dicho método de tratamiento según el artículo 54(5) EPC.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la expresión génica relativa de citocinas y quimiocinas seleccionadas tal como se determina mediante PCR cuantitativa (los datos representan la media ± EEM de 3 preparaciones de tumor invasivo primario y de células metastásicas correspondientes derivadas independientemente (adenocarcinoma ductal de páncreas, ADC) y se normalizan con respecto a la expresión en células previas a la invasión).

La figura 2 es una ilustración de proteínas de fusión a modo de ejemplo de esta divulgación. Una primera proteína de fusión comprende un componente extracelular de CSF2R α y un componente intracelular de IL-2R γ y una segunda proteína de fusión comprende un componente extracelular de CSF2R β y un componente intracelular de IL-2R β . La ilustración muestra las proteínas de fusión ubicadas en una membrana celular (por ejemplo, membrana de célula T) y formando un complejo, que es un heterodímero.

Las figuras 3A y 3B muestran (A) las secuencias de CDR3 de las cadenas V α 4 y V β 9 clonadas a partir de los clones de células T específicos de MSLN₄₀₆₋₄₁₄ con la avidez más alta aislados a partir de ratones de tipo natural y Msln^{-/-} y (B) los resultados de la evaluación por citometría de flujo del porcentaje de células T CD8+ del donante (selección basándose en Thy1.1+/V β 9+ (indicativo de TCR₁₀₄₅⁺ específico de mesotelina)) en la sangre de los animales, tras la transferencia adoptiva, que expresaron un motivo extracelular de GM-CSFR (panel izquierdo). La detección del motivo en las células T indicó la expresión de la proteína de fusión GM-CSF::IL-2R. La tinción de monocitos (panel derecho), que expresan GM-CSFR, sirvió como control positivo.

Las figuras 4A a 4C muestran (A) el porcentaje global de células T del donante (selección basándose en Thy1.1+, CD8+) detectadas en la sangre a lo largo del tiempo tras la transferencia adoptiva (días 0, 5, 10, 15, 20, 25); (B) el porcentaje de células T CD8+ del donante (selección basándose en Thy1.1+/V β 9+) en la sangre el día 0 y el día 14 (paneles izquierdo y derecho, respectivamente) en las que se detectó el motivo extracelular de GM-CSFR, que indica la expresión de la proteína de fusión GM-CSF::IL-2R; (C) el porcentaje relativo de células del donante en la sangre representado por células que expresan la proteína de fusión GM-CSF::IL-2R ("GM/IL2R TCR₁₀₄₅") en comparación con aquellas en las que no se detectó la proteína de fusión ("TCR₁₀₄₅"), que indica que la proteína de fusión proporciona una ventaja de supervivencia y/o expansión a las células T que expresan TCR₁₀₄₅ que se dirigen a mesotelina en este estudio.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona proteínas de fusión que modulan la señalización en una célula huésped, tal como una célula inmunitaria. Por ejemplo, las proteínas de fusión de esta divulgación pueden proporcionar una señal de activación o proliferación a una célula T humana, en las que la célula T puede estar opcionalmente modificada por ingeniería para tener un receptor de células T (TCR) o receptor de antígeno quimérico (CAR), o ambos, específico de antígeno cancerígeno preferido. Por ejemplo, estas proteínas de fusión pueden interaccionar con una citocina o quimiocina de interés para proporcionar células T, tales como células T que contienen un TCR o CAR

específico de antígeno, una ventaja de supervivencia y/o expansión, que es consistente con la utilidad del constructo para mejorar la persistencia de y la exposición a las células transferidas, incluyendo mejorar la eficacia en un microambiente tumoral.

- 5 En la presente descripción, debe entenderse que cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de razón o intervalo de números enteros incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo recitado y, cuando sea apropiado, fracciones del mismo (tales como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique lo contrario. Además, debe entenderse que cualquier intervalo numérico recitado en el presente documento relacionado con cualquier característica física, tal como subunidades poliméricas, tamaño o grosor, incluye cualquier número entero dentro del intervalo recitado, a menos que se indique lo contrario. Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa \pm el 20 % del intervalo, el valor o la estructura indicado, a menos que se indique lo contrario. Debe entenderse que los términos "un" y "uno/a", tal como se usan en el presente documento, se refieren a "uno o más" de los componentes enumerados. Debe entenderse que el uso de la alternativa (por ejemplo, "o") significa una, ambas o cualquier combinación de los mismos de las alternativas. Tal como se usa en el presente documento, los términos "incluir", "tener" y "comprender" se usan como sinónimos, y se pretende que los términos y variantes de los mismos se interpreten como no limitativos.

El término "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o a las etapas especificados o a aquellos que no afectan materialmente a las características básicas de una invención reivindicada.

- 20 Por ejemplo, un dominio, una región o un módulo (por ejemplo, un dominio de unión, una región bisagra, un módulo de ligador) de proteína o una proteína (que puede tener uno o más dominios, regiones o módulos) "consiste esencialmente en" una secuencia de aminoácidos particular cuando la secuencia de aminoácidos de un dominio, una región o un módulo o una proteína incluye extensiones, delecciones, mutaciones o cualquier combinación de las mismas (por ejemplo, aminoácidos en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal o entre dominios) que, en combinación, contribuyen a como máximo el 20 % (por ejemplo, como máximo el 15 %, el 10 %, el 8 %, el 6 %, el 5 %, el 4 %, el 3 %, el 2 % o el 1 %) de la longitud de un dominio, una región o un módulo o una proteína y no afectan sustancialmente a la actividad (es decir, no reducen la actividad en más del 50 %, tal como no más del 40 %, el 30 %, el 25 %, el 20 %, el 15 %, el 10 %, el 5 % o el 1 %) del/de los dominio(s), la(s) región/regiones, el/los módulo(s) o la proteína (por ejemplo, la afinidad de unión a la diana de una proteína de unión).

- 30 Tal como se usa en el presente documento, "heterólogo" o "no endógeno" o "exógeno" se refiere a cualquier gen, proteína, compuesto, molécula o actividad que no es nativo con respecto a una célula huésped o un sujeto, o es cualquier gen, proteína, compuesto, molécula o actividad nativo con respecto a un huésped o una célula huésped que se ha alterado o mutado de manera que la estructura, la actividad o ambas son diferentes entre las moléculas nativas y mutadas. En determinadas realizaciones, las moléculas heterólogas, no endógenas o exógenas (por ejemplo, receptores, ligandos) pueden no ser endógenas con respecto a una célula huésped o un sujeto, sino que en su lugar pueden haberse añadido ácidos nucleicos que codifican para tales moléculas a una célula huésped mediante conjugación, transformación, transfección, electroporación, o similares, en las que la molécula de ácido nucleico añadida puede integrarse en el genoma de una célula huésped o puede existir como material genético extracromosómico (por ejemplo, como un plásmido u otro vector autorreplicante). El término "homólogo" se refiere a una molécula o actividad encontrada en o derivada de una célula huésped, especie o cepa. Por ejemplo, un gen o una molécula heterólogo o exógeno que codifica para la molécula puede ser homólogo con respecto a un huésped nativo o una molécula de la célula huésped o un gen que codifica para la molécula, respectivamente, pero puede tener una alteración de la estructura, secuencia, nivel de expresión o combinaciones de los mismos. Una molécula no endógena puede ser de la misma especie, de una especie diferente o una combinación de las mismas.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "endógeno" o "nativo" se refiere a un gen, una proteína, un compuesto, una molécula o una actividad que normalmente está presente en un huésped o una célula huésped y no tiene alteraciones modificadas por ingeniería.

- 50 Un "dominio de unión" (también denominado "región de unión" o "resto de unión"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula, tal como un péptido, un oligopéptido, un polipéptido o una proteína, que presenta la capacidad de asociarse, unirse o combinarse de manera específica y no covalente con una molécula diana. Un dominio de unión incluye cualquier pareja de unión que se produce de manera natural, sintética, semisintética o producida de manera recombinante para una molécula biológica u otra diana de interés o proteína de unión de la misma. En algunas realizaciones, el dominio de unión es un dominio de unión a antígeno de, por ejemplo, un anticuerpo o receptor de células T (TCR) o comprende un dominio de unión funcional o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, anticuerpos de dominio, sFv, scFv, Fab, TCR de cadena sencilla (scTCR), o similares). En otras realizaciones, un dominio de unión o porciones de unión del mismo se unen a una citocina o quimiocina, tal como GM-CSF.

- 65 En algunas realizaciones, "se une específicamente" se refiere a una asociación o unión de un dominio de unión, o una proteína de fusión del mismo, a una molécula diana con una afinidad o K_a (es decir, una constante de asociación en equilibrio de una interacción de unión particular con unidades de $1/M$) igual o superior a 10^5 M^{-1} , o se une a tal molécula diana mientras no se asocia ni se une significativamente con ninguna otra molécula ni ningún otro componente en una muestra. Los dominios de unión (o las proteínas de fusión de los mismos) pueden clasificarse

como dominios de unión (o proteínas de fusión de los mismos) de "alta afinidad" o dominios de unión (o proteínas de fusión de los mismos) de "baja afinidad". Los dominios de unión de "alta afinidad" se refieren a aquellos dominios de unión con una K_a de al menos 10^7 M^{-1} , al menos 10^8 M^{-1} , al menos 10^9 M^{-1} , al menos 10^{10} M^{-1} , al menos 10^{11} M^{-1} , al menos 10^{12} M^{-1} o al menos 10^{13} M^{-1} . Los dominios de unión de "baja afinidad" se refiere a aquellos dominios de unión con una K_a de hasta 10^7 M^{-1} , hasta 10^6 M^{-1} , hasta 10^5 M^{-1} . Alternativamente, la afinidad puede definirse como una constante de disociación en equilibrio (K_d) de una interacción de unión particular con unidades de M (por ejemplo, de 10^{-5} M a 10^{-13} M). En determinadas realizaciones, un dominio de unión puede tener "afinidad potenciada", que se refiere a un dominio de unión seleccionado o modificado por ingeniería con una unión más fuerte a un antígeno diana que un dominio de unión de tipo natural (o parental). Por ejemplo, la afinidad potenciada puede deberse a una K_a (constante de asociación en equilibrio) para el antígeno diana que es mayor que la del dominio de unión de tipo natural, o deberse a una K_d (constante de disociación) para el antígeno diana que es menor que la del dominio de unión de tipo natural, o deberse a una velocidad de disociación (K_{off}) para el antígeno diana que es menor que la del dominio de unión de tipo natural. Se conocen una variedad de ensayos para identificar dominios de unión de la presente divulgación que se unen específicamente a una diana particular, así como para determinar las afinidades del dominio de unión o de la proteína de fusión, tales como inmunotransferencia de tipo Western, ELISA y análisis Biacore® (véanse también, por ejemplo, Scatchard *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; y las patentes estadounidenses n.ºs 5.283.173, 5.468.614 o el equivalente).

Tal como se usa en el presente documento, una "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido que, en una cadena sencilla, tiene al menos dos dominios distintos, en la que los dominios no se encuentran de manera natural juntos en una proteína. Una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión puede construirse usando PCR, diseñarse por ingeniería recombinante, o similares, o tales proteínas de fusión pueden prepararse usando métodos de síntesis de proteínas. Una proteína de fusión puede contener además otros componentes (por ejemplo, unidos covalentemente), tales como una etiqueta o una molécula bioactiva. En determinadas realizaciones, una proteína de fusión expresada o producida por una célula huésped (por ejemplo, una célula T) se ubica en la superficie celular, donde la proteína de fusión se ancla a la membrana celular con una porción de la proteína de fusión (por ejemplo, que contiene un dominio de unión) ubicada extracelularmente y una porción de la proteína de fusión (por ejemplo, que contiene un dominio de señalización) ubicada intracelularmente.

Tal como se usa en el presente documento, un "componente extracelular" se refiere a una porción o a un dominio de una proteína de fusión ubicado en el exterior de una célula y que es capaz de interaccionar o asociarse específicamente con otra molécula u otro compuesto para inducir un efecto biológico al transmitir una señal al componente intracelular de la proteína de fusión. Por ejemplo, un dominio de unión a citocina es capaz de asociarse con una citocina específica e inducir la transducción de señales en la célula a través del componente intracelular de la proteína de fusión.

Tal como se usa en el presente documento, un "componente intracelular" se refiere a una porción o a un dominio de una proteína de fusión ubicado en el citoplasma de una célula huésped y que es capaz de transmitir señales a la célula a través de un "dominio de señalización intracelular" al interaccionar con una molécula de señalización o con otro componente intracelular.

Tal como se usa en el presente documento, un "dominio de señalización intracelular" es una porción intracelular de la molécula, tal como una usada en una proteína de fusión de esta divulgación, que puede fomentar de manera directa o indirecta una respuesta, tal como una respuesta biológica o fisiológica coestimuladora, positiva o activante en una célula al recibir la señal apropiada. En determinadas realizaciones, un dominio de señalización intracelular forma parte de una proteína o un complejo proteico que recibe una señal cuando se une, o por sí mismo puede unirse directamente a una molécula diana para transmitir una señal a otros componentes en la célula. Un dominio de señalización intracelular puede fomentar directamente una respuesta celular cuando contiene uno o más motivos o dominios de señalización, tales como un motivo Box 1 (por ejemplo, dominio de interacción con JAK encontrado en una cadena gamma habitual), un dominio cinasa, un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM), un dominio coestimulador, o similares. En otras realizaciones, un dominio de señalización intracelular fomentará indirectamente una respuesta celular al asociarse con una o más de otras proteínas que, a su vez, fomentarán directamente una respuesta celular.

Tal como se usa en el presente documento, una "porción del mismo" se refiere a una región particular de una proteína, tal como una porción extracelular, una porción transmembrana o una porción intracelular, o se refiere a un dominio, un motivo o un fragmento de una proteína o región de proteína que conserva la función asociada con el dominio, el motivo o el fragmento de la proteína o región de proteína. Por ejemplo, una porción del mismo de un dominio de unión a citocina significa un fragmento de este dominio que todavía es capaz de unirse a la citocina.

En determinadas realizaciones, una proteína de fusión puede contener un "ligador", que puede proporcionar una función espaciadora para facilitar la interacción de dos proteínas de fusión de cadena sencilla o el posicionamiento de uno o más dominios de unión, de modo que la estructura polipeptídica resultante mantiene una afinidad de unión específica por una molécula diana o mantiene la actividad de señalización (por ejemplo, actividad de dominio efector), o ambos. Los ligadores a modo de ejemplo incluyen desde una hasta aproximadamente diez repeticiones de Gly_xSer_y, en la que x e y son independientemente un número entero desde 1 hasta 5.

5 "Aminoácidos de unión" o "residuos de aminoácido de unión" se refiere a uno o más (por ejemplo, aproximadamente 2-20) residuos de aminoácido entre dos motivos, regiones o dominios adyacentes de una proteína de fusión, tal como entre un dominio de unión y un componente hidrófobo adyacente, o en uno o ambos extremos de un componente hidrófobo. Los aminoácidos de unión pueden ser el resultado del diseño de constructo de una proteína de fusión (por ejemplo, los residuos de aminoácido resultantes del uso de un sitio de enzima de restricción durante la construcción de una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión). En determinadas realizaciones, los aminoácidos de unión forman un ligador, tal como aquellos que tienen desde una hasta 10 aproximadamente diez repeticiones de Gly_xSer_y, en la que x e y son independientemente un número entero desde 1 hasta 5.

15 Tal como se usa en el presente documento, una "célula del sistema inmunitario" significa cualquier célula del sistema inmunitario que se origina a partir de una célula madre hematopoyética en la médula ósea, que da lugar a dos linajes principales, una célula progenitora mieloide (que da lugar a células mieloides tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, megacariocitos y granulocitos) y una célula progenitora linfoide (que da lugar a células linfoides tales como células T, células B y células citolíticas naturales (NK)). Las células del sistema inmunitario a modo de ejemplo incluyen una célula T CD4+, una célula T CD8+, una célula T doblemente negativa CD4- CD8-, una célula T γδ, una célula T reguladora, una célula citolítica natural y una célula dendrítica. Los macrófagos y las células dendríticas pueden denominarse "células presentadoras de antígeno" o "APC", que son células especializadas que 20 pueden activar las células T cuando un receptor de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en la superficie de la APC complejada con un péptido interacciona con un TCR en la superficie de una célula T.

25 Una "célula T" es una célula del sistema inmunitario que madura en el timo y produce receptores de células T (TCR). Las células T pueden ser indiferenciadas (no expuestas a antígeno; expresión aumentada de CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 y CD45RA y expresión disminuida de CD45RO en comparación con las T_{CM}), células T de memoria (T_M) (experiencia con antígeno y de vida larga) y células efectoras (experiencia con antígeno, citotóxicas). Las T_M 30 pueden dividirse adicionalmente en subconjuntos de células T de memoria centrales (T_{CM}, expresión aumentada de CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO y CD95 y expresión disminuida de CD54RA en comparación con las células T indiferenciadas) y células T de memoria efectoras (T_{EM}, expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28, CD45RA y expresión aumentada de CD127 en comparación con las células T indiferenciadas o las T_{CM}). Las células T 35 efectoras (T_E) se refieren a linfocitos T citotóxicos CD8+ con experiencia con antígeno que tienen una expresión disminuida de CD62L, CCR7, CD28 y son positivas para granzima y perforina en comparación con las T_{CM}. Otras células T a modo de ejemplo incluyen células T reguladoras, tales como células T reguladoras CD4+ CD25+ (Foxp3+) y células Treg17, así como células T restringidas Tr1, Th3, CD8+CD28- y Qa-1.

40 35 Un "receptor de células T" (TCR) se refiere a una molécula encontrada en la superficie de células T (o linfocitos T) que, en asociación con CD3, generalmente es responsable de reconocer los antígenos unidos a las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). El TCR tiene un heterodímero unido por disulfuro de las cadenas α y β altamente variables (también conocidas como TCRα y TCRβ, respectivamente) en la mayoría de las células T. En 45 un pequeño subconjunto de células T, el TCR está constituido por un heterodímero de cadenas γ y δ variables (también denominadas TCRγ y TCRδ, respectivamente). Cada cadena del TCR es un miembro de la super familia de inmunoglobulinas y presenta un dominio variable de inmunoglobulina N-terminal, un dominio constante de inmunoglobulina, una región transmembrana y una cola citoplásica corta en el extremo C-terminal (véase Janeway *et al.*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3^a ed., Current Biology Publications, pág. 4:33, 1997). El TCR, tal como se usa en la presente divulgación, puede ser de diversas especies animales, incluyendo humano, ratón, rata, gato, perro, cabra, caballo u otros mamíferos. Los TCR pueden estar unidos a células (es decir, tienen una región o un dominio transmembrana) o en forma soluble.

50 55 Las "moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad" (moléculas de CMH), que se usan indistintamente con y se entiende que también se refieren al homólogo humano antígeno leucocitario humano (moléculas de HLA), se refieren a glicoproteínas que transportan antígenos peptídicos a una superficie celular. Las moléculas de CMH de clase I son heterodímeros que consisten en una cadena α que atraviesa la membrana (con tres dominios α) y una microglobulina β2 asociada no covalentemente. Las moléculas de CMH de clase II se componen de dos glicoproteínas transmembrana, α y β, ambas de las cuales atraviesan la membrana. Cada cadena tiene dos dominios. Las moléculas de CMH (HLA) de clase I transportan péptidos que se originan en el citosol a la superficie celular, donde las células T CD8+ reconocen el complejo péptido:CMH (o péptido:HLA en humanos). Las moléculas de CMH (HLA) de clase II transportan péptidos que se originan en el sistema vesicular a la superficie celular, donde las células T CD4+ los reconocen. Una molécula de CMH puede ser de diversas especies animales, incluyendo humano, ratón, rata u otros mamíferos.

60 65 Una "molécula de ácido nucleico" o un polinucleótido puede estar en forma de ARN o ADN, que incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético. Una molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria, y si es monocatenaria, puede ser la cadena codificante o no codificante (cadena antisentido). Una molécula codificante puede tener una secuencia codificante idéntica a una secuencia codificante conocida en la técnica o puede tener una secuencia codificante diferente que, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, o

por corte y empalme, puede codificar para el mismo polipéptido.

También se contemplan variantes de las moléculas de ácido nucleico o los polinucleótidos de esta divulgación. Los polinucleótidos variantes son al menos el 90 % y preferiblemente el 95 %, el 99 % o el 99,9 % idénticos a uno de los polinucleótidos de secuencia definida tal como se describen en el presente documento, o que se hibrida con uno de esos polinucleótidos de secuencia definida en condiciones de hibridación rigurosas de cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a aproximadamente 65-68 °C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50 % a aproximadamente 42 °C. Las variantes polinucleotídicas conservan la capacidad de codificar para un dominio de unión o una proteína de fusión del mismo que tiene la funcionalidad descrita en el presente documento.

El término "riguroso" se usa para referirse a condiciones que se entienden habitualmente en la técnica como rigurosas. La rigurosidad de hibridación viene determinada principalmente por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturalizantes tales como la formamida. Ejemplos de condiciones rigurosas para la hibridación y el lavado son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a aproximadamente 65-68 °C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50 % a aproximadamente 42 °C (véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

También pueden usarse condiciones más rigurosas (tales como mayor temperatura, menor fuerza iónica, mayor cantidad de formamida u otro agente desnaturalizante); sin embargo, se verá afectada la velocidad de hibridación. En casos que conciernen a la hibridación de desoxioligonucleótidos, las condiciones de hibridación rigurosas a modo de ejemplo adicionales incluyen lavado en 6x SSC, pirofosfato de sodio al 0,05 % a 37 °C (para oligonucleótidos de 14 bases), a 48 °C (para oligonucleótidos de 17 bases), a 55 °C (para oligonucleótidos de 20 bases) y a 60 °C (para oligonucleótidos de 23 bases).

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico. Los vectores pueden ser, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, virus o fagos. Un "vector de expresión" es un vector que es capaz de dirigir la expresión de una proteína codificada por uno o más genes portados por el vector cuando está presente en el entorno apropiado.

Los "retrovirus" son virus que tienen un genoma de ARN. Un "gamma-retrovirus" se refiere a un género de la familia *Retroviridae*. Los gamma-retrovirus a modo de ejemplo incluyen virus de células madre de ratón, virus de la leucemia murina, virus de la leucemia felina, virus del sarcoma felino y virus de la reticuloendoteliosis aviar.

Un "lentivirus" se refiere a un género de retrovirus que son capaces de infectar células en división y no en división. Varios ejemplos de lentivirus incluyen el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana: incluyendo VIH de tipo 1 y VIH de tipo 2); virus de la anemia infecciosa equina; virus de la inmunodeficiencia felina (VIF); virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB); y virus de la inmunodeficiencia símica (VIS).

El término "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de polipéptido o molécula de ácido nucleico, significa dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales a lo largo de una región especificada (por ejemplo, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de identidad), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación, o región designada, tal como se mide usando métodos conocidos en la técnica, tales como un algoritmo de comparación de secuencias, mediante alineación manual o mediante inspección visual. Por ejemplo, algoritmos preferidos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.* (Nucleic Acids Res. 25:3389, 1977) y Altschul *et al.* (J. Mol. Biol. 215:403, 1990), respectivamente.

"Tratar" o "tratamiento" o "mejorar" se refiere a la gestión médica de una enfermedad, un trastorno o una afección de un sujeto (por ejemplo, un humano o mamífero no humano, tal como un primate, un caballo, un perro, un ratón o una rata). En general, se administra una dosis o un régimen de tratamiento apropiado que comprende una célula huésped que expresa una proteína de fusión de esta divulgación y, opcionalmente, un adyuvante o una terapia complementaria en una cantidad suficiente para producir un beneficio terapéutico o profiláctico. Un beneficio terapéutico o profiláctico/preventivo incluye desenlace clínico mejorado; reducción o alivio de los síntomas asociados con una enfermedad; aparición disminuida de síntomas; calidad de vida mejorada; estado libre de enfermedad más largo; disminución del grado de enfermedad, estabilización del estado patológico; retraso de la progresión de la enfermedad; remisión; supervivencia; supervivencia prolongada; o cualquier combinación de los mismos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de una proteína de fusión o una célula que expresa una proteína de fusión de esta divulgación, en el contexto de una enfermedad o afección que está tratándose, se refiere a la cantidad de proteína de fusión o al número de células suficiente para dar como resultado la mejora de uno o más síntomas de la enfermedad que está tratándose de manera estadísticamente significativa (por ejemplo, reducir la infección, reducir el tamaño tumoral, inhibir el crecimiento del cáncer, o similares).

Ácidos nucleicos, proteínas de fusión y células huésped

- 5 Las moléculas de ácido nucleico que codifican para una cualquiera o más de las proteínas de fusión descritas en el presente documento, en las que el dominio de unión a citocina puede no ser un dominio de unión a IL-2, pueden insertarse en un vector apropiado (por ejemplo, un vector viral o un vector plasmídico no viral) para su introducción en una célula huésped de interés (por ejemplo, una célula T).
- 10 En algunas realizaciones, el componente intracelular codificado se compone de una porción intracelular, un dominio de señalización intracelular o una porción del mismo de un IL-2R γ , IL-2R β , IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, IL-21R o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones relacionadas, el componente intracelular codificado se compone de una porción intracelular, un dominio de señalización intracelular o una porción del mismo de un IL-2R γ humano, IL-2R β humano, IL-4R humano, IL-7R humano, IL-9R humano, IL-15R humano, IL-21R humano o cualquier combinación de los mismos.
- 15 En determinadas realizaciones, un polinucleótido codifica para (a) una primera proteína de fusión y la totalidad o una porción del dominio de unión a citocina es una primera porción del dominio de unión a citocina y (b) una segunda proteína de fusión que comprende una segunda porción del dominio de unión a citocina, un segundo dominio transmembrana y un segundo componente intracelular que comprende un segundo dominio de señalización de cadena de IL-2R o una porción de señalización del mismo y, opcionalmente, que comprende además un polinucleótido que codifica para un receptor de antígeno o una porción del mismo o una proteína de unión a antígeno, tal como un TCR o CAR específico de antígeno.
- 20 En realizaciones adicionales, el polinucleótido que codifica para una proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular que comprende una porción intracelular de IL-2R γ , un dominio de señalización intracelular o una porción del mismo, opcionalmente un IL-2R γ humano. En realizaciones particulares, un polinucleótido codifica para una proteína de fusión que comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular, en el que una porción no de unión a citocina del componente extracelular, el dominio transmembrana y el componente intracelular de la proteína de fusión codificada tienen al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10. En realizaciones todavía adicionales, la porción extracelular no de unión a citocina codificada, el dominio transmembrana y la porción intracelular de la proteína de fusión codificada se componen de o consisten en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10.
- 25 En determinadas realizaciones, cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente codifica para una proteína de fusión que comprende un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina y una porción de una cadena de IL-2R que comprende una porción extracelular no de unión a citocina, un dominio transmembrana de una cadena de IL-2R y una porción intracelular de una cadena de IL-2R, tal como un IL-2R γ o IL-2R γ humano. En realizaciones adicionales, la porción extracelular no de unión a citocina, el dominio transmembrana y la porción intracelular de la cadena de IL-2R están codificados por un polinucleótido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad con los nucleótidos 961-1.308 de SEQ ID NO:6. En realizaciones todavía adicionales, la porción extracelular no de unión a citocina, el dominio transmembrana y la porción intracelular de la cadena de IL-2R están codificados por un polinucleótido que comprende o que consiste en los nucleótidos 961-1.308 de SEQ ID NO:6.
- 30 En realizaciones aún adicionales, el polinucleótido que codifica para una proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular que comprende una porción intracelular de IL-2R β , un dominio de señalización intracelular o una porción del mismo, opcionalmente un IL-2R β humano. En realizaciones particulares, un polinucleótido codifica para una proteína de fusión que comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular, en el que el dominio transmembrana y el componente intracelular de la proteína de fusión codificada tienen al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:12. En realizaciones todavía adicionales, el dominio transmembrana codificado y la porción intracelular de la proteína de fusión codificada se componen de o consisten en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12.
- 35 En determinadas realizaciones, cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente codifica para una proteína de fusión que comprende un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina, un dominio transmembrana de una cadena de IL-2R y una porción intracelular de una cadena de IL-2R, tal como un IL-2R β o IL-2R β humano. En realizaciones adicionales, el dominio transmembrana y la porción intracelular de la cadena de IL-2R están codificados por un polinucleótido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:12.
- 40 En realizaciones aún adicionales, el polinucleótido que codifica para una proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular que comprende una porción intracelular de IL-2R γ , un dominio de señalización intracelular o una porción del mismo, opcionalmente un IL-2R γ humano. En realizaciones particulares, un polinucleótido codifica para una proteína de fusión que comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular, en el que el dominio transmembrana y el componente intracelular de la proteína de fusión codificada tienen al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:12. En realizaciones todavía adicionales, el dominio transmembrana codificado y la porción intracelular de la proteína de fusión codificada se componen de o consisten en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12.
- 45 En determinadas realizaciones, cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente codifica para una proteína de fusión que comprende un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina, un dominio transmembrana de una cadena de IL-2R y una porción intracelular de una cadena de IL-2R, tal como un IL-2R β o IL-2R β humano. En realizaciones adicionales, el dominio transmembrana y la porción intracelular de la cadena de IL-2R están codificados por un polinucleótido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:12.
- 50 En realizaciones aún adicionales, el polinucleótido que codifica para una proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular que comprende una porción intracelular de IL-2R β , un dominio de señalización intracelular o una porción del mismo, opcionalmente un IL-2R β humano. En realizaciones particulares, un polinucleótido codifica para una proteína de fusión que comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular, en el que el dominio transmembrana y el componente intracelular de la proteína de fusión codificada tienen al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:12. En realizaciones todavía adicionales, el dominio transmembrana codificado y la porción intracelular de la proteína de fusión codificada se componen de o consisten en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12.
- 55 En determinadas realizaciones, cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente codifica para una proteína de fusión que comprende un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina, un dominio transmembrana de una cadena de IL-2R y una porción intracelular de una cadena de IL-2R, tal como un IL-2R γ o IL-2R γ humano. En realizaciones adicionales, el dominio transmembrana y la porción intracelular de la cadena de IL-2R están codificados por un polinucleótido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:12.
- 60 En determinadas realizaciones, cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente codifica para una proteína de fusión que comprende un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina, un dominio transmembrana de una cadena de IL-2R y una porción intracelular de una cadena de IL-2R, tal como un IL-2R β o IL-2R β humano. En realizaciones adicionales, el dominio transmembrana y la porción intracelular de la cadena de IL-2R están codificados por un polinucleótido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:12.
- 65 En determinadas realizaciones, cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente codifica para una proteína de fusión que comprende un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina, un dominio transmembrana de una cadena de IL-2R y una porción intracelular de una cadena de IL-2R, tal como un IL-2R γ o IL-2R γ humano. En realizaciones adicionales, el dominio transmembrana y la porción intracelular de la cadena de IL-2R están codificados por un polinucleótido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:12.

menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad con los nucleótidos 1.315-2.250 de SEQ ID NO:7. En realizaciones todavía adicionales, la porción extracelular no de unión a citocina, el dominio transmembrana y la porción intracelular de la cadena de IL-2R están codificados por un polinucleótido que comprende o que consiste en los nucleótidos 1.315-2.250 de SEQ ID NO:7.

- 5 En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, el componente extracelular codificado comprende un dominio extracelular o una porción del mismo de un CSF2RA (también denominado GM-CSFR o CSF2R), un CSF2RB (también denominado IL3RB, IL5RB, CD131), un CSF1R (también denominado M-CSFR o CSFR), un CSF3R (también denominado G-CSFR o CD114), un CXCR2 (también denominado IL8RA, IL8RB, IL8R2 o CD182) o un CCR8 (también denominado CY6 o TER1). En realizaciones adicionales, el componente extracelular codificado comprende un dominio extracelular o una porción del mismo de un CSF2RA humano, un CSF2RB humano, un CSF1R humano, un CSF3R humano, un CXCR2 humano o un CCR8 humano.
- 10 En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, el dominio de unión a citocina codificado o la porción de unión del mismo se une específicamente a un GM-CSF (también denominado CSF2), un M-CSF (también denominado CSF1), un G-CSF (también denominado CSF3), un CXCL1, un CXCL2 o un CCL1. En realizaciones adicionales, el dominio de unión a citocina codificado o la porción de unión del mismo se une específicamente a un GM-CSF humano, un M-CSF humano, un G-CSF humano, un CXCL1 humano, un CXCL2 humano o un CCL1 humano.
- 15 En determinadas realizaciones, cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente codifica para una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a citocina específico de CSF2, tal como una porción extracelular de un CSF2RA o CSF2RB. En realizaciones adicionales, la porción extracelular de un CSF2RA está codificada por un polinucleótido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad con los nucleótidos 1-960 de SEQ ID NO:6. En realizaciones todavía adicionales, la porción extracelular de un CSF2RA está codificada por un polinucleótido que comprende o que consiste en los nucleótidos 1-960 de SEQ ID NO:6. En realizaciones relacionadas, la porción extracelular codificada de un CSF2RA es al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:9. En realizaciones todavía adicionales, la porción extracelular codificada de un CSF2RA se compone de o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:9. En otras realizaciones, la porción extracelular de un CSF2RB está codificada por un polinucleótido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad con los nucleótidos 1-1.314 de SEQ ID NO:7. En realizaciones todavía adicionales, la porción extracelular de un CSF2RB está codificada por un polinucleótido que comprende o que consiste en los nucleótidos 1-1.314 de SEQ ID NO:6. En realizaciones relacionadas, la porción extracelular codificada de un CSF2RB es al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11. En aún otras realizaciones, la porción extracelular codificada de un CSF2RB se compone de o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:11.
- 20 En determinadas realizaciones, cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente codifica para una proteína de fusión que comprende un dominio transmembrana, tal como un dominio transmembrana de un IL-2RG, IL-2RB, CSF2RA, CSF2RB, CSF1R, CSF3R, CXCR2, CCR8, IL-2RA, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, IL-21R, CD2, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 ζ , CD25, CD27, CD28, CD40, CD79A, CD79B, CD80, CD86, CD95 (Fas), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD200R, CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD272 (BTLA), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), CD279 (PD-1), CD300, CD357 (GITR), A2aR, DAP10, FcR α , FcR β , FcR γ , Fyn, GAL9, KIR, Lck, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PTCH2, ROR2, Ryk, Slp76, SIRP α , pT α , TCR α , TCR β , TIM3, TRIM, LPA5 o Zap70. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana codificado es de un IL-2RG humano, un IL-2RB humano, un CSF2RA humano, un CSF2RB humano, un CSF1R humano, un CSF3R humano, un CXCR2 humano, un CCR8 humano, un IL-2RA humano, un IL-4R humano, un IL-7R humano, un IL-9R humano, un IL-15R humano, un IL-21R humano, un CD2 humano, un CD3 ϵ humano, un CD3 δ humano, un CD3 ζ humano, un CD25 humano, un CD27 humano, un CD28 humano, un CD40 humano, un CD79A humano, un CD79B humano, un CD80 humano, un CD86 humano, un CD95 (Fas) humano, un CD134 (OX40) humano, un CD137 (4-1BB) humano, un CD150 (SLAMF1) humano, un CD152 (CTLA4) humano, un CD200R humano, un CD223 (LAG3) humano, un CD270 (HVEM) humano, un CD272 (BTLA) humano, un CD273 (PD-L2) humano, un CD274 (PD-L1) humano, un CD278 (ICOS) humano, un CD279 (PD-1) humano, un CD300 humano, un CD357 (GITR) humano, un A2aR humano, un DAP10 humano, un FcR α humano, un FcR β humano, un FcR γ humano, un Fyn humano, un GAL9 humano, un KIR humano, un Lck humano, un LAT humano, un LRP humano, un NKG2D humano, un NOTCH1 humano, un NOTCH2 humano, un NOTCH3 humano, un NOTCH4 humano, un PTCH2 humano, un ROR1 humano, un ROR2 humano, un Ryk humano, un Slp76 humano, un SIRP α humano, un pT α humano, un TCR α humano, un TCR β humano, un TIM3 humano, un TRIM humano, un LPA5 humano o un Zap70 humano. En realizaciones particulares, cualquiera de los polinucleótidos mencionados anteriormente codifica para una proteína de fusión que comprende un dominio transmembrana que es al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:22 ó 23. En otras realizaciones, el dominio transmembrana codificado comprende o
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:22 ó 23.

En el caso de un polinucleótido que codifica para una proteína de unión a antígeno, una proteína de unión a antígeno codificada de este tipo puede comprender un dominio transmembrana según cualquiera de las 5 realizaciones de dominio transmembrana mencionadas anteriormente.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido que codifica para una proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular; en el que el componente extracelular codificado comprende una porción extracelular de un CSF2RA y una porción extracelular no de unión a citocina de IL-2R γ y el dominio transmembrana codificado y el componente intracelular codificado comprenden una porción de IL-2R γ . En 10 realizaciones adicionales, un polinucleótido codifica para una proteína de fusión que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1. En realizaciones todavía adicionales, un 15 polinucleótido codifica para una proteína de fusión que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido que codifica para una proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular; en el que el componente extracelular codificado comprende una porción extracelular de un CSF2RB y el dominio transmembrana codificado y el componente intracelular codificado comprenden una porción de IL-2R β . En realizaciones adicionales, un polinucleótido codifica para una proteína de fusión que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al 20 menos el 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:2. En realizaciones adicionales, un polinucleótido codifica para una proteína de fusión que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:2.

Los primeros 22 aminoácidos de las SEQ ID NO:1 y 9 y los primeros 16 aminoácidos de las SEQ ID NO:2 y 11 corresponden a una secuencia señal para CSF2RA y CSF2RB humanos, respectivamente. En determinadas 30 realizaciones en las que una proteína de fusión de las SEQ ID NO:1, 2, 9 y 11 se expresa en la superficie de una célula huésped será una proteína madura, es decir, la proteína madura carece de la secuencia señal. Por ejemplo, una proteína madura de CSF2RA según SEQ ID NO:9 corresponde a los aminoácidos 23-320 de SEQ ID NO:9 y una proteína madura de CSF2RB según SEQ ID NO:11 corresponde a los aminoácidos 17-438 de SEQ ID NO:11.

En algunas realizaciones, un polinucleótido codifica para una proteína de fusión que comprende un dominio de señalización intracelular o un fragmento funcional o una porción del mismo de IL-2R, tal como IL-2R γ o IL-2R β . En otras realizaciones, un polinucleótido codifica para una proteína de unión a antígeno que comprende un dominio de señalización intracelular o un fragmento funcional o una porción del mismo de un CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 ζ , CD25, CD27, 40 CD28, CD40, CD47, CD79A, CD79B, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), CARD11, DAP10, DAP12, FcR α , FcR β , FcR γ , Fyn, Lck, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, ROR2, Ryk, Slp76, pT α , TCR α , TCR β , TRIM, Zap70, PTCH2 o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un dominio de señalización intracelular codificado o un fragmento funcional o una porción del mismo de una proteína de fusión o proteína de unión a antígeno no comprende ningún CD3 ζ .

Tal como se usa en el presente documento, el término "recombinante" o "no natural" se refiere a un organismo, un microorganismo, una célula, una molécula de ácido nucleico o un vector que incluye al menos una alteración genética o se ha modificado mediante la introducción de una molécula de ácido nucleico exógena, en el que tales alteraciones o modificaciones se introducen mediante ingeniería genética. Las alteraciones genéticas incluyen, por ejemplo, modificaciones que introducen moléculas de ácido nucleico expresables que codifican para proteínas, 45 proteínas de fusión o enzimas, u otras adiciones, delecciones, sustituciones de molécula de ácido nucleico u otra alteración funcional del material genético de una célula. Las modificaciones adicionales incluyen, por ejemplo, regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón. En determinadas realizaciones, una célula, tal como una célula T, obtenida de un sujeto puede convertirse en una célula 50 no natural o recombinante (por ejemplo, una célula T no natural o recombinante) mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión tal como se describe en el presente documento y mediante el cual la célula expresa una proteína de fusión.

En determinadas realizaciones, un polinucleótido codifica para una pluralidad de proteínas de fusión, una pluralidad 60 de proteínas de unión a antígeno o una combinación de las mismas, en el que dos o más de la pluralidad de proteínas de fusión, proteínas de unión a antígeno o combinaciones de las mismas están separadas por un sitio de escisión. En algunas realizaciones, un sitio de escisión comprende un sitio de escisión de proteasa de 2 a aproximadamente 20 aminoácidos amino-terminal con respecto a una proteína de fusión o proteína de unión a antígeno, un sitio de escisión de proteasa de 2 a aproximadamente 20 aminoácidos carboxilo-terminal con respecto 65 a una proteína de fusión o proteína de unión a antígeno, una secuencia de aminoácidos de autoescisión o una combinación de los mismos.

- En determinadas realizaciones, un sitio de escisión codificado es una secuencia de aminoácidos de autoescisión que comprende un péptido 2A de teschovirus-1 porcino (P2A) (SEQ ID NO:13), virus *Thosea asigna* (T2A) (SEQ ID NO:14), virus de la rinitis equina A (E2A) (SEQ ID NO:15), virus de la glosopeda (F2A) (SEQ ID NO:16) o cualquier combinación de los mismos (véase, por ejemplo, Kim *et al.*, PLOS One 6:e18556, 2011). En realizaciones adicionales, un polinucleótido que codifica para una pluralidad de proteínas de fusión, una pluralidad de proteínas de unión a antígeno o una combinación de las mismas incluye una secuencia que codifica para un péptido de autoescisión ubicado entre dos o más de las proteínas, que puede ser: (a) un péptido P2A codificado por un polinucleótido tal como se expone en SEQ ID NO:17; (b) un péptido P2A codificado por un polinucleótido con codones optimizados tal como se expone en SEQ ID NO:18; (c) un péptido T2A codificado por un polinucleótido tal como se expone en SEQ ID NO:19; (d) un péptido E2A codificado por un polinucleótido tal como se expone en SEQ ID NO:20; (e) un péptido F2A codificado por un polinucleótido tal como se expone en SEQ ID NO:21; o (f) cualquier combinación de los mismos.
- En determinadas realizaciones, un polinucleótido de esta divulgación codifica para una primera proteína de fusión, una segunda proteína de fusión y, opcionalmente, una proteína de unión a antígeno, en el que la primera proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular que comprende, consiste en o tiene al menos el 90 % de identidad con un IL-2R γ , opcionalmente un IL-2R γ humano, una porción intracelular o un dominio de señalización intracelular o una porción del mismo, u opcionalmente tiene al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10. En algunas realizaciones, un polinucleótido codifica para una primera proteína de fusión que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1. En realizaciones todavía adicionales, un polinucleótido codifica para una primera proteína de fusión que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:1.
- En realizaciones adicionales, un polinucleótido de esta divulgación codifica para una primera proteína de fusión, una segunda proteína de fusión y, opcionalmente, una proteína de unión a antígeno, en el que la primera proteína de fusión codificada comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular que comprende, consiste en o tiene al menos el 90 % de identidad con un IL-2R β , opcionalmente un IL-2R β humano, una porción intracelular o un dominio de señalización intracelular o una porción del mismo, u opcionalmente tiene al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12. En algunas realizaciones, un polinucleótido codifica para una primera proteína de fusión que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:2. En realizaciones adicionales, un polinucleótido codifica para una primera proteína de fusión que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO:2.
- En realizaciones todavía adicionales, un polinucleótido de esta divulgación codifica para una primera proteína de fusión, una segunda proteína de fusión y, opcionalmente, una proteína de unión a antígeno, en el que la primera proteína de fusión codificada tiene al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:1 o expuesta en los aminoácidos 23-435 (proteína de fusión madura) de SEQ ID NO:1; la segunda proteína de fusión codificada tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:2 o expuesta en los aminoácidos 17-749 (proteína de fusión madura) de SEQ ID NO:2; y la proteína de unión a antígeno opcional comprende un TCR específico de antígeno o un CAR específico de antígeno, en la que el antígeno es opcionalmente un antígeno específico de cáncer, tal como un antígeno WT-1, mesotelina, ROR1 o ciclina-A1.
- En cada una de estas realizaciones, una primera proteína de fusión, una segunda proteína de fusión y una proteína de unión a antígeno pueden estar todas ellas codificadas por un único polinucleótido, o pueden estar todas ellas codificadas por dos polinucleótidos (por ejemplo, un primer polinucleótido codifica para la primera proteína de fusión y un segundo polinucleótido codifica para la segunda proteína de fusión y la proteína de unión a antígeno; o un primer polinucleótido codifica para la segunda proteína de fusión y un segundo polinucleótido codifica para la primera proteína de fusión y la proteína de unión a antígeno; o un primer polinucleótido codifica para la primera proteína de fusión y la segunda proteína de fusión y un segundo polinucleótido codifica para la proteína de unión a antígeno, o cualquier combinación de los mismos).
- En determinadas realizaciones, un único polinucleótido codifica para una primera proteína de fusión de esta divulgación y una segunda proteína de fusión de esta divulgación, en el que un polinucleótido que codifica para un péptido de autoescisión tal como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO:17-21 está dispuesto entre y une

- el polinucleótido que codifica para la primera proteína de fusión y el polinucleótido que codifica para la segunda proteína de fusión. En realizaciones particulares, la primera proteína de fusión está codificada por un polinucleótido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:6 y la segunda proteína de fusión está codificada por un polinucleótido que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:7. En realizaciones adicionales, la primera proteína de fusión está codificada por un polinucleótido que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:6 y la segunda proteína de fusión está codificada por un polinucleótido que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:7.
- En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, un polinucleótido que codifica para una proteína de fusión, una proteína de unión a antígeno o ambas de esta divulgación puede tener codones optimizados para potenciar o maximizar la expresión en determinados tipos de células, tales como células T (Scholten *et al.*, Clin. Immunol. 119: 135-145, 2006).
- Cualquier de los polinucleótidos de esta divulgación puede estar contenido en un vector o administrarse a una célula huésped (por ejemplo, célula T) a través de un vector. Un vector que codifica para un virus de núcleo se denomina en el presente documento "vector viral". Existe una gran cantidad de vectores virales disponibles adecuados para su uso con la composiciones de la presente divulgación, incluyendo los identificados para aplicaciones de terapia génica en humanos (véase Pfeifer y Verma, Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177, 2001). Los vectores virales adecuados incluyen vectores basados en virus de ARN, tales como vectores derivados de retrovirus, por ejemplo, vectores derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (VLM), e incluyen vectores derivados de retrovirus más complejos, por ejemplo, vectores derivados de lentivirus. Los vectores derivados del VIH-1 pertenecen a esta categoría. Otros ejemplos incluyen vectores de lentivirus derivados del VIH-2, el VIF, el virus de la anemia infecciosa equina, el VIS y el virus de Maedi-Visna (lentivirus ovino). Los métodos de uso de vectores virales retrovirales y lentivirales y células de empaquetamiento para transducir células huésped de mamíferos con partículas virales que contienen transgenes de receptor de antígeno quimérico se conocen en la técnica y se han descrito previamente, por ejemplo, en la patente estadounidense 8.119.772; Walchli *et al.*, PLoS One 6:327930, 2011; Zhao *et al.*, J. Immunol. 174:4415, 2005; Engels *et al.*, Hum. Gene Ther. 14:1155, 2003; Frecha *et al.*, Mol. Ther. 18:1748, 2010; Verhoeven *et al.*, Methods Mol. Biol. 506:97, 2009. También están disponibles comercialmente sistemas de expresión y constructos de vectores retrovirales y lentivirales.
- En determinadas realizaciones, un vector viral se usa para introducir un polinucleótido no endógeno que codifica para una proteína de fusión tal como se divulga en el presente documento o un polinucleótido no endógeno que codifica para una proteína de unión a antígeno específica de una diana tal como se divulga en el presente documento, o ambos. Un vector viral puede ser un vector retroviral o un vector lentiviral. Un vector viral también puede incluir secuencias de ácido nucleico que codifican para un marcador para la transducción. Los marcadores de transducción para vectores virales se conocen en la técnica e incluyen marcadores de selección, que pueden conferir farmacorresistencia, o marcadores detectables, tales como marcadores fluorescentes o proteínas de superficie celular que pueden detectarse mediante métodos tales como citometría de flujo. En realizaciones particulares, un vector viral comprende además un marcador genético para la transducción que comprende proteína fluorescente verde (GFP), un dominio extracelular de CD2 humano o un EGFR humano truncado (huEGFRt; véase Wang *et al.*, Blood 118:1255, 2011). Cuando el genoma de un vector viral comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que van a expresarse en una célula huésped como transcritos independientes, el vector viral también puede comprender secuencias adicionales entre los dos (o más) transcritos, permitiendo la expresión bicistrónica o multicistrónica. Los ejemplos de tales secuencias usadas en vectores virales incluyen sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), sitios de escisión de furina, péptido 2A viral o cualquier combinación de los mismos.
- También pueden usarse otros vectores para el suministro de polinucleótidos, incluyendo vectores virales de ADN, incluyendo, por ejemplo, vectores basados en adenovirus y vectores basados en virus adenoasociados (VAA); vectores derivados del virus del herpes simple (VHS), incluyendo vectores de amplicón, VHS con replicación defectuosa y VHS atenuado (Krisky *et al.*, Gene Ther. 5: 1517, 1998).
- También pueden usarse otros vectores recientemente desarrollados para usos de terapia génica con las composiciones y los métodos de esta divulgación. Tales vectores incluyen los derivados de baculovirus y α -virus (Jolly, D J. 1999. Emerging Viral Vectors, págs. 209-40 en Friedmann T. ed. The Development of Human Gene Therapy. Nueva York: Cold Spring Harbor Lab) o vectores plasmídicos (tales como bella durmiente u otros vectores de transposición). En algunas realizaciones, un vector viral o plasmídico comprende además un marcador genético para la transducción (por ejemplo, proteína fluorescente verde, huEGFRt).
- En algunas realizaciones, un vector comprende un polinucleótido tal como se divulga en el presente documento que codifica para más de una proteína de fusión y que contiene un polinucleótido que codifica para una proteína de unión a antígeno de esta divulgación. Por ejemplo, un vector puede contener un polinucleótido que codifica para dos proteínas de fusión diferentes y que contiene un polinucleótido que codifica para una proteína de unión a antígeno de esta divulgación.

En algunas realizaciones, el TCR específico de antígeno es específico de un antígeno restringido de HLA (CMH) de clase I. También se encuentran dentro del alcance de esta divulgación realizaciones en las que el antígeno específico de cáncer comprende WT-1, mesotelina, ROR1 o ciclina-A1.

- 5 Cualquiera de los polinucleótidos divulgados en el presente documento está contenido en una célula huésped, en el que la célula huésped expresa y produce una proteína de fusión y una proteína de unión a antígeno. En algunas realizaciones, una célula huésped de esta divulgación comprende una pluralidad de proteínas de unión a antígeno, tales como tanto un TCR como un CAR.
 - 10 En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona una célula huésped que comprende una primera proteína de fusión, una segunda proteína de fusión y una proteína de unión a antígeno, en la que la primera proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular que se compone de o tiene al menos el 90 % de identidad con un IL-2R γ , opcionalmente un IL-2R γ humano, una porción intracelular o un dominio de señalización intracelular o una porción del mismo, u opcionalmente tiene al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10; en la que la segunda proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción del mismo y un componente intracelular que se compone de o tiene al menos el 90 % de identidad con un IL-2R β , opcionalmente un IL-2R β humano, un dominio de señalización intracelular o una porción del mismo y/o un dominio de señalización o una porción del mismo de una cadena de IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R o IL-21R, u opcionalmente tiene al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12; y en la que la proteína de unión a antígeno comprende un receptor de células T (TCR); un receptor de antígeno quimérico (CAR); y opcionalmente comprende una pluralidad de proteínas de unión a antígeno. En algunas realizaciones, una célula huésped de esta divulgación comprende una pluralidad de proteínas de unión a antígeno, tales como tanto un TCR como un CAR.
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
 - 50
 - 55
 - 60
 - 65
- En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica para una primera proteína de fusión, una segunda proteína de fusión y una proteína de unión a antígeno, en la que la primera proteína de fusión codificada tiene al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-435 (proteína de fusión madura) de SEQ ID NO:1; la segunda proteína de fusión codificada tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 17-749 (proteína de fusión madura) de SEQ ID NO:2; y la proteína de unión a antígeno opcional comprende un TCR específico de antígeno o un CAR específico de antígeno, en la que el antígeno es un antígeno específico de cáncer, tal como un antígeno WT-1, mesotelina, ROR1 o ciclina-A1.
- En determinadas realizaciones, una célula huésped que contiene un polinucleótido de esta divulgación comprende al menos dos proteínas de fusión codificadas que son capaces de asociarse para formar un heteromultímero en la superficie de la célula huésped, opcionalmente en la que el heteromultímero en la superficie de la célula huésped es un heterodímero o heterotrímero.
- En realizaciones adicionales, las proteínas de fusión comprenden, cada una, un componente extracelular diferente, en las que los componentes extracelulares diferentes son capaces de asociarse entre sí para formar un dominio de unión a citocina funcional. En realizaciones particulares, uno de los componentes extracelulares codificados diferentes se compone de o tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un CSF2R α , opcionalmente un CSF2R α humano, una porción extracelular, un dominio extracelular de unión a citocina o una porción del mismo, u opcionalmente tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, y el otro componente extracelular diferente se compone de o tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un CSF2R β , opcionalmente un CSF2R β humano, una porción extracelular, un dominio extracelular de unión a citocina o una porción del mismo, u opcionalmente tiene al menos el 90 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. En cualquiera de estas realizaciones, las proteínas de fusión comprenden, cada una, un componente intracelular diferente, en las que los componentes intracelulares diferentes son capaces de asociarse entre sí para formar un dominio de señalización intracelular funcional. En realizaciones adicionales, al menos uno de los componentes intracelulares diferentes se compone de o tiene al menos el 90 % de identidad con una porción intracelular de IL-2R γ , un dominio de señalización intracelular o porciones del mismo, u opcionalmente tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En realizaciones aún adicionales, al menos uno de los componentes intracelulares diferentes se compone de o tiene al menos el 90 % de identidad con una porción intracelular de IL-2R β , IL-4RA, IL-7R, IL-15RA o IL-21R, un dominio de señalización intracelular o porciones del mismo que, en cada caso, individualmente, opcionalmente se deriva de humano, u opcionalmente tiene al menos el 90 % de identidad con SEQ ID NO:12.

- El TCR se une a un complejo antígeno::HLA con alta afinidad, tal como a una K_a igual o superior a 10^7 M^{-1} . En realizaciones adicionales, el TCR específico de antígeno codificado es heterólogo con respecto a la célula huésped o con respecto a un sujeto al que se le administrará la célula huésped. En realizaciones particulares, el TCR codificado es específico de un antígeno restringido de HLA de clase I. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno es específica de WT-1, mesotelina, ROR1 o ciclina-A1. En algunas realizaciones, el TCR es un TCR específico de WT-1 designado como C4.
- En realizaciones todavía adicionales, una célula huésped que contiene un polinucleótido que codifica para una proteína de fusión o una pluralidad de proteínas de fusión de esta divulgación puede contener además un polinucleótido que codifica para una proteína de unión a antígeno, en la que la proteína de unión a antígeno es un CAR. Los CAR a modo de ejemplo expresados por la célula huésped pueden comprender un dominio de unión a antígeno extracelular y un dominio de señalización intracelular capaz de suministrar una señal primaria a una célula T y, opcionalmente, un dominio coestimulador; o el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular de una molécula coestimuladora, tal como de CD28, CD137 (4-1BB) o ICOS. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio de señalización intracelular de un CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 ζ , CD25, CD27, CD28, CD40, CD47, CD79A, CD79B, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), CARD11, DAP10, DAP12, FcR α , FcR β , FcR γ , Fyn, Lck, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, ROR2, Ryk, Slp76, pT α , TCR α , TCR β , TRIM, Zap70, PTCH2 o cualquier combinación de los mismos y/o en el que la porción de señalización intracelular del receptor de antígeno químico comprende un dominio de señalización de activación primario que opcionalmente se deriva de CD3 ζ y no comprende ningún dominio coestimulador y/o no comprende ningún dominio de señalización de CD28, ningún dominio de señalización de 4-1BB ni ningún dominio de señalización de ICOS.
- En determinadas realizaciones, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un dominio coestimulador de: (a) un CD137 (4-1BB), CD27, CD28, ICOS, OX40 (CD134) o cualquier combinación de los mismos; (b) un CD137 (4-1BB), CD28 o cualquier combinación de los mismos; (c) un CD28; o (d) un CD137 (4-1BB). En realizaciones particulares, el dominio de señalización intracelular codificado comprende un segundo dominio de señalización intracelular, tal como un dominio de señalización intracelular de un CD137 (4-1BB).
- En realizaciones adicionales, el dominio de unión a antígeno codificado del CAR comprende un fragmento de unión a anticuerpo o scFv específico del antígeno. En algunas realizaciones, una célula huésped tal como se describe en el presente documento comprende al menos dos proteínas de unión a antígeno, en la que las al menos dos proteínas de unión a antígeno incluyen un TCR y un CAR. En determinadas realizaciones, la expresión de la proteína de fusión en una célula T que comprende un TCR o receptor de antígeno químico específico de un antígeno da como resultado un aumento de al menos aproximadamente 1,5 veces, 2 veces o 3 veces de la supervivencia, la expansión, la citotoxicidad, la secreción de citocinas y/o la respuesta a múltiples tandas de estimulación, por la célula T, en respuesta a la unión del antígeno y/o tras la administración a un sujeto, y/o da como resultado un aumento de al menos aproximadamente 1,5 veces, 2 veces o 3 veces del tiempo de supervivencia, la supervivencia libre de enfermedad o la mejora de uno o más síntomas de la enfermedad de un sujeto al que se le administra la célula, en comparación con una célula sustancialmente igual que la célula T pero que no contiene la proteína de fusión.
- Las células huésped a modo de ejemplo para su uso con las proteínas de fusión, las proteínas de unión a antígeno y los polinucleótidos que codifican para las mismas de esta divulgación incluyen una célula del sistema inmunitario, tal como una célula T. Una célula T puede ser una célula T CD4+ o una célula T CD8+.
- En algunas realizaciones, las células huésped capaces de expresar una proteína de fusión de esta divulgación en la superficie celular son células inmunitarias. En algunas realizaciones, las células huésped capaces de expresar una proteína de fusión de esta divulgación en la superficie celular son células T, incluyendo células o líneas celulares primarias derivadas de humano, ratón, rata u otros mamíferos. Si se obtiene de un mamífero, una célula T puede obtenerse a partir de numerosas fuentes, incluyendo sangre, médula ósea, ganglio linfático, timo u otros tejidos o líquidos. Una célula T puede estar enriquecida o purificada. Las líneas de células T se conocen bien en la técnica, algunas de las cuales se describen en Sandberg *et al.*, Leukemia 21:230, 2000. En determinadas realizaciones, se usan células T que carecen de expresión endógena de las cadenas TCR α y β . Tales células T pueden carecer de manera natural la expresión endógena de las cadenas TCR α y β o pueden haberse modificado para bloquear la expresión (por ejemplo, células T de un ratón transgénico que no expresa las cadenas TCR α y β o células que se han manipulado para inhibir la expresión de las cadenas TCR α y β) o para inactivar la cadena TCR α , la cadena TCR β o ambos genes. En algunas realizaciones, las células T pueden modificarse por ingeniería para expresar un TCR específico de un antígeno particular.
- En determinadas realizaciones, una célula huésped transfectada para expresar una proteína de fusión de esta divulgación es una célula T funcional, tal como una célula T específica de virus, una célula T citotóxica específica de antígeno tumoral, una célula T indiferenciada, una célula T madre de memoria, una célula T de memoria central o efectora, células T $\gamma\delta$ o una célula T reguladora CD4+ CD25+. En realizaciones adicionales, una molécula de ácido

nucleico que codifica para una proteína de fusión de esta divulgación se introduce en células T CD8+ en masa, células T CD8+ indiferenciadas, células T_{CM} CD8+, células T_{EM} CD8+ o cualquier combinación de las mismas. En realizaciones todavía adicionales, una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión de esta divulgación se introduce en células T CD4+ en masa, células T CD4+ indiferenciadas, células T_{CM} CD4+, células T_{EM} CD4+ o cualquier combinación de las mismas. En otras realizaciones, una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión de esta divulgación se introduce en una población de células T enriquecida en células T CD8+ indiferenciadas y células T_{CM} CD8+. En todavía otras realizaciones, una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión de esta divulgación se introduce en una población de células T enriquecidas en células T CD4+ indiferenciadas y células T_{CM} CD4+. En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, las células T contienen además una molécula de ácido nucleico que codifica para un receptor de células T (TCR) específico de antígeno modificado por ingeniería, un TCR de alta afinidad específico de antígeno modificado por ingeniería, una molécula coestimuladora exógena, un receptor de antígeno quimérico (CAR) o cualquier combinación de los mismos.

15 En determinadas realizaciones, una célula huésped transfectada para expresar una proteína de fusión de esta divulgación es una célula citolítica natural funcional.

Pueden añadirse una o más citocinas factor de crecimiento que fomentan la proliferación de células T que expresan una proteína de fusión de esta divulgación al cultivo usado para expandir las células T. Las citocinas pueden ser humana o no humanas. Las citocinas factor de crecimiento a modo de ejemplo que pueden usarse para fomentar la proliferación de células T incluyen GM-CSF, IL-2, IL-15, o similares.

En determinadas realizaciones, una célula T huésped transfectada para expresar una proteína de fusión de esta divulgación es una célula T CD4+ que también expresa un TCR de alta afinidad específico de antígeno específico de un antígeno restringido de HLA (CMH) de clase I (véase Soto *et al.*, Cancer Immunol Immunother. 62: 359-369, 2013).

En determinadas realizaciones, una célula T huésped transfectada para expresar una proteína de fusión de esta divulgación también expresa un TCR recombinante específico de un antígeno cancerígeno. En algunas realizaciones, el antígeno cancerígeno es un WT1. "WT1" se refiere al tumor de Wilms 1, un factor de transcripción que contiene cuatro motivos de dedos de zinc en el extremo C-terminal y un dominio de unión a ADN rico en prolina/glutamina en el extremo N-terminal. WT1 desempeña un papel esencial en el desarrollo normal del aparato genitourinario y está mutado en un pequeño subconjunto de pacientes con tumores de Wilms. Se ha observado una alta expresión de WT1 en diversos cánceres, incluyendo cáncer de mama, cáncer de ovario, leucemias agudas, neoplasias vasculares, melanomas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, sarcoma de huesos y partes blandas y cáncer de esófago. Se ha observado corte y empalme alternativo para WT1.

En determinadas realizaciones, una célula T huésped transfectada para expresar una proteína de fusión de esta divulgación también expresa un TCR recombinante específico de mesotelina. "Mesotelina" (MSLN) se refiere a un gen que codifica para una proteína precursora que se escinde en dos productos, factor potenciador de megacariocitos y mesotelina. El factor potenciador de megacariocitos funciona como una citocina que puede estimular la formación de colonias en megacariocitos de médula ósea. La mesotelina es una proteína de superficie celular anclada a glicosilfosfatidilinositol que puede funcionar como una proteína de adhesión celular. Esta proteína se sobreexpresa en mesoteliomas epiteliales, cánceres de ovario y carcinomas de células escamosas específicos. 45 El corte y empalme alternativo da como resultado múltiples variantes de transcriptos.

En determinadas realizaciones, una célula T huésped transfectada para expresar una proteína de fusión de esta divulgación también expresa un TCR recombinante específico de ciclina-A1.

50 En determinadas realizaciones, una célula T huésped transfectada para expresar una proteína de fusión de esta divulgación también expresa un CAR.

Usos

55 Las enfermedades que pueden tratarse con células de la presente invención incluyen cáncer, enfermedades infecciosas (infecciones virales, bacterianas, protozoarias) y enfermedades inmunitarias (por ejemplo, autoinmunitarias). La inmunoterapia adoptiva y la terapia génica son tratamientos prometedores para diversos tipos de cáncer (Morgan *et al.*, Science 314:126, 2006; Schmitt *et al.*, Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009; June, J. Clin. Invest. 117:1466, 2007) y enfermedades infecciosas (Kitchen *et al.*, PLoS One 4:38208, 2009; Rossi *et al.*, Nat. Biotechnol. 25:1444, 2007; Zhang *et al.*, PLoS Pathog. 6:e1001018, 2010; Luo *et al.*, J. Mol. Med. 89:903, 2011).

En determinadas realizaciones, se trata un trastorno hiperproliferativo, es decir, una neoplasia maligna hemática o un cáncer sólido. Por ejemplo, la neoplasia maligna hemática que va a tratarse puede ser leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia eosinofílica crónica (LEC), síndrome mielodisplásico (SMD), linfoma no Hodgkin (LNH) o mieloma múltiple (MM). El cáncer sólido a modo de ejemplo que va a tratarse puede ser cáncer biliar, cáncer de vejiga, carcinoma de huesos y partes blandas,

- 5 tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, adenocarcinoma colorrectal, cáncer colorrectal, tumor desmoide, cáncer embrionario, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, adenocarcinoma gástrico, glioblastoma multiforme, tumor ginecológico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma maligno, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, adenocarcinoma ductal de páncreas, tumor astrocítico primario, cáncer de tiroides primario, cáncer de próstata, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, rhabdomiosarcoma, cáncer de piel, sarcoma de partes blandas, tumor de células germinales de testículo, cáncer urotelial, sarcoma uterino o cáncer uterino.
- 10 Otros tipos de cáncer a modo de ejemplo que pueden tratarse incluyen adenocarcinoma de mama, próstata y colon; todas las formas de carcinoma broncogénico de pulmón; leucemia mieloide; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; bronquioma; síndrome carcinoide maligno; cardiopatía carcinoide; y carcinoma (por ejemplo, de Walker, de células basales, basoescamoso, de Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, de Krebs 2, de células de Merkel, mucinoso, de pulmón de células no pequeñas, de células de avena, papilar, escirroso, bronquiolar, broncogénico, de células escamosas y de células transicionales). Los tipos adicionales de cáncer que pueden tratarse incluyen trastornos histiocíticos; histiocitosis maligna; leucemia; enfermedad de Hodgkin; pequeño inmunoproliferativo; linfoma no Hodgkin; plasmocitoma; reticulocitosis; melanoma; condroblastoma; condroma; condrosarcoma; fibroma; fibrosarcoma; tumores de células gigantes; histiocitoma; lipoma; liposarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; cordoma; craneofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefroma; miosarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma; timoma; tumor trofoblástico. Además, también se contemplan los siguientes tipos de cánceres como susceptibles de tratamiento: adenoma; colangioma; colesteatoma; ciclindrroma; cistadenocarcinoma; cistadenoma; tumor de células granulosas; ginandroblastoma; hepatoma; hidradenoma; tumor de células de los islotes; tumor de células de Leydig; papiloma; tumor de células de Sertoli; tumor de células de la teca; leiomiorama; leiomiosarcoma; mioblastoma; mioma; miosarcoma; rhabdomioma; rhabdomiosarcoma; ependimoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepiteloma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma no cromafínico. Los tipos de cánceres que pueden tratarse también incluyen angioqueratoma; hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatosis; glomangioma; hemangiendoteloma; hemangioma; hemangiopericitoma; hemangiosarcoma; linfangioma; linfangiomoma; linfangiosarcoma; pinealoma; carcinosarcoma; condrosarcoma; cistosarcoma filoides; fibrosarcoma; hemangiosarcoma; leiomiosarcoma; leucosarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; miosarcoma; mixosarcoma; carcinoma de ovario; rhabdomiosarcoma; sarcoma; neoplasias; neurofibromatosis; y displasia cervical.
- 35 Una ejemplificación de la variedad de trastornos hiperproliferativos susceptibles de una terapia de células T con proteínas de fusión son cánceres de células B, incluyendo linfomas de células B (tales como diversas formas de enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (LNH) o linfomas del sistema nervioso central), leucemias (tales como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas, transformación blástica de células B de leucemia mieloide crónica) y mielomas (tales como mieloma múltiple). Los cánceres de células B adicionales incluyen linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma solitario de hueso, plasmocitoma extraóseo, linfoma extraganglionar de células B de la zona marginal de tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), linfoma ganglionar de células B de la zona marginal, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primario, linfoma/leucemia de Burkitt, proliferaciones de células B de potencial maligno incierto, granulomatosis linfomatíde y trastorno linfoproliferativo posttrasplante.
- 40 45 Las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias incluyen artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artrosis, policondritis, artritis psoriásica, psoriasis, dermatitis, polimiositis/dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, miositis inflamatoria, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia y esclerosis sistémica, síndrome de CREST, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), meningitis, encefalitis, uveítis, colitis, glomerulonefritis, afecciones alérgicas, eccema, asma, afecciones que implican infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, ateroesclerosis, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión leucocitaria, lupus eritematoso sistémico (LES), lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus discoide, mielitis lúpica, cerebritis lúpica, diabetes de aparición juvenil, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica, neuromielitis óptica, fiebre reumática, corea de Sydenham, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis de Wegener y enfermedad de Churg-Strauss, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis/angitis por hipersensibilidad, ANCA y vasculitis reumatoide), anemia aplásica, anemia de Diamond-Blackfan, anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AHAI), anemia perniciosa, aplasia pura de la serie roja (APSR), deficiencia de factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapédesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (SNC), síndrome de fallo multiorgánico, miastenia grave, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de anticuerpos antimembrana basal glomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo de trasplante de órganos sólidos, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), penfigoide ampolloso, penfigo, poliendoocrinopatías autoinmunitarias,

5 espondiloartropatías seronegativas, enfermedad de Reiter, síndrome de la persona rígida, arteritis de células gigantes, nefritis por inmunocomplejos, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), púrpura de Henoch-Schönlein, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria de testículo y ovario incluyendo orquitis y 10 ooforitis autoinmunitarias, hipotiroidismo primario, enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluyendo tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Graves, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), diabetes tipo I también denominada diabetes mellitus dependiente de insulina (DMID) y síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfoide (HIV), bronquiolitis obliterante (no trasplante), 15 neumonía intersticial inespecífica (NII), síndrome de Guillain-Barré, vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu), vasculitis de vasos medianos (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nudosa), poliarteritis nudosa (PAN), espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), glomerulonefritis rápidamente progresiva, cirrosis biliar primaria, celiaquía (enteropatía por gluten), crioglobulinemia, crioglobulinemia asociada con hepatitis, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), 20 arteriopatía coronaria, fiebre mediterránea familiar, poliangitis microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Wiskott-Aldrich y tromboangiitis obliterante.

En realizaciones particulares, se trata leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica aguda o leucemia mielocítica crónica.

20 Las enfermedades infecciosas incluyen aquellas asociadas con agentes infecciosos e incluyen cualquiera de una variedad de bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *B. anthracis*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *H. pylori*, *V. cholerae*, *Listeria spp.*, *Rickettsia spp.*, *Chlamydia spp.*, y similares, patógenas), micobacterias y parásitos (incluyendo cualquier miembro parásito conocido de los protozoos). Los virus infecciosos incluyen virus eucariotas, tales como adenovirus, bunyavirus, virus del herpes, papovavirus, virus del papiloma (por ejemplo, VPH), paramixovirus, picornavirus, rabdovirus (por ejemplo, rabia), ortomixovirus (por ejemplo, gripe), poxvirus (por ejemplo, variolovacuna), reovirus, retrovirus, lentivirus (por ejemplo, VIH), flavivirus (por ejemplo, VHC, VHB), o similares. En determinadas realizaciones, una infección con patógenos citosólicos cuyos antígenos se procesan y presentan con moléculas de HLA (CMH) de clase I se trata con las proteínas de fusión de esta divulgación.

30 En una realización particular, las células del linaje de células T que expresan proteínas de fusión administradas a un sujeto son células singénicas, alogénicas o autólogas.

35 Las composiciones farmacéuticas que incluyen células huésped de esta divulgación pueden administrarse de manera apropiada a la enfermedad o afección que va a tratarse (o prevenirse) tal como determinan los expertos en la técnica médica. Una dosis apropiada, una duración adecuada y la frecuencia de administración de las 40 composiciones serán determinadas por factores tales como el estado del paciente, el tamaño, el tipo y la gravedad de la enfermedad, la forma particular del principio activo y el método de administración. Los excipientes adecuados incluyen agua, solución salina, dextrosa, glicerol, o similares, y combinaciones de los mismos.

45 En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a una célula huésped para su uso en un método de aumento de la actividad de una célula inmunitaria, potenciación o prolongación de una respuesta inmunitaria, estimulación de una respuesta de células T específica de antígeno, inhibición de una ruta de señalización inmunosupresora, tratamiento de un cáncer o un tumor, inhibición de la inmunorresistencia de las células cancerosas o tratamiento de una 50 infección, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una célula huésped que expresa una proteína de fusión tal como se describe en el presente documento. En realizaciones adicionales, una célula huésped para su uso en cualquiera de los métodos mencionados anteriormente expresa además un TCR específico de antígeno modificado por ingeniería, un TCR de alta afinidad específico de antígeno modificado por ingeniería, un CAR, una molécula coestimuladora o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones particulares, se proporcionan métodos de tratamiento de leucemia, que comprenden expresar conjuntamente una proteína de fusión tal como se divulga en el presente documento y un TCR específico de antígeno recombinante.

55 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de inducción o potenciación de una respuesta de HLA de clase I por una célula T CD4+, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de la célula huésped de la presente invención, en los que la célula huésped es una célula T CD4+.

60 En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, los métodos son eficaces en ausencia de la administración de IL-2 exógena.

65 En todavía otras realizaciones, un sujeto de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente se trata además con una terapia complementaria, tal como una quimioterapia. Los agentes quimioterápicos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; alquilsulfonatos tales como busulfán, imrosulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosfaoramida y trimetilolmelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina,

ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirrubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pterofterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos depirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antisuprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucida; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; Ionidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mepidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSKTM; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo paclitaxel (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (Taxotere™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas, capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, la terapia complementaria es una vacuna, un inhibidor de una señal de inmunosupresión, un inhibidor de B-Raf, un inhibidor de MEK, un inhibidor de tirosina cinasa, un agente citotóxico, un agente quimioterápico o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el inhibidor de una señal de inmunosupresión es un anticuerpo o ARNip. En algunas realizaciones, el anticuerpo o ARNip es específico de PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, LAG3, KIR, CD244, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, GAL9, TIM3, A2aR o cualquier combinación de los mismos.

Ejemplos

EJEMPLO 1

PERFIL DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS EN CÉLULAS DE CARCINOMA

Se obtuvieron perfiles de los factores solubles expresados por células de carcinoma de páncreas purificadas en cultivo mediante PCR cuantitativa. Brevemente, se extrajo el ARN total (kit RNeasy Miniprep, Qiagen) a partir de cultivos primarios de células epiteliales tumorales *KPC* y células metastásicas correspondientes en los hígados de los mismos animales ($n=3$ cada uno) y también a partir de células epiteliales ductales pancreáticas previas a la invasión. Se convirtió el ARN en ADNc usando un kit de transcriptasa inversa de alta capacidad (Applied Biosystems). Se realizó PCR cuantitativa usando la mezcla maestra SYBR Green y se ejecutaron muestras por triplicado en un termociclador C1000 (BioRad). Los cebadores se basaron en la bibliografía publicada o se diseñaron usando el software Primer-BLAST. Se normalizaron las cuantificaciones con respecto a *cycA* endógeno y se calculó el cambio en veces de la expresión génica en células invasivas y metastásicas en comparación con células previas a la invasión usando el método $\Delta\Delta CT$. El modelo de ratón *Kras^{LSL-G12D/+}*; *Trp53^{LSL-R172H/+}*; *Cre* (*KPC*) diseñado por ingeniería genética de ADC se describió previamente por Hingorani *et al.* (Cancer Cell 7:469, 2005).

El perfil secretor de células invasivas y metastásicas reveló un compromiso sustancial con la síntesis de factores de crecimiento y quimiocinas implicados en el tráfico tanto de granulocitos (por ejemplo, CXCL1, CXCL2) como de monocitos (por ejemplo, CCL2) (datos no mostrados). El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) también estaban regulados por incremento en células epiteliales tumorales en comparación con células ductal previas a la invasión. La expresión génica relativa mediante PCR cuantitativa confirmó el aumento en estos factores en células invasivas frente a previas a la invasión (figura 1, véase Stromnes *et al.*, Gut 63:1769, 2014). De estas tres citocinas mielopoyéticas, GM-CSF tuvo el efecto más pronunciado sobre el fomento de la supervivencia de células supresoras de origen mieloide granulocíticas (MDSC) *in vitro* (datos no mostrados).

Tal como se describe en el presente documento, las realizaciones proporcionadas en el presente documento, tales como complejos y proteínas de fusión, se basan en algún aspecto en estas características y/o características relacionadas de los microambientes tumorales, tales como ambientes de tumores metastásicos o invasivos. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones y métodos para potenciar la actividad antitumoral de las inmunoterapias (por ejemplo, en la figura 2 se ilustra una proteína de fusión a modo de ejemplo que se compone de

componentes extracelulares de CSF2R (GM-CSFR) y componentes intracelulares de IL-2R).

EJEMPLO 2

5 GENERACIÓN DE TCR ESPECÍFICOS DE MESOTELINA DE ALTA AFINIDAD

Se inmunizaron ratones B6 Msln^{-/-} y de tipo natural (WT) con un adenovirus recombinante que expresaba Msln murina (Ad-Msln) para producir células T reactivas. Se aislaron células T específicas de los epítopos Msln³⁴³⁻³⁵¹, Msln⁴⁸⁴⁻⁴⁹², Msln⁵⁴⁴⁻⁵⁵² y Msln⁵⁸³⁻⁵⁹¹ a partir de ratones Msln^{-/-}, pero no de ratones WT, consistente con la tolerancia central (Stromnes *et al.*, Cancer Cell 28:638, 2015). Sin embargo, tanto los ratones Msln^{-/-} como los ratones WT generaron respuestas a Msln⁴⁰⁶⁻⁴¹⁴, que previamente se demostró que era procesado y presentado por la línea celular de cáncer de ovario B6 (Hung *et al.*, Gene Ther. 14:921, 2007). Las células T específicas de Msln⁴⁰⁶⁻⁴¹⁴ aisladas a partir de ratones WT expresaron uniformemente la cadena de TCR Vβ9, tal como hicieron la mayoría de las células T específicas de Msln⁴⁰⁶⁻⁴¹⁴ a partir de ratones Msln^{-/-} (Stromnes *et al.*, 2015). A pesar de expresar niveles similares de Vβ9, las líneas de células T específicas de Msln⁴⁰⁶⁻⁴¹⁴ a partir de ratones Msln^{-/-} se tiñeron más brillantes con tetrámero, consistente con una mayor afinidad (Stromnes *et al.*, 2015). Los clones de células T específicas de Msln⁴⁰⁶⁻⁴¹⁴ de ratones Msln^{-/-} también respondieron a concentraciones de antígeno más bajas que los clones de ratones WT correspondientes (Stromnes *et al.*, 2015). La mayoría de los clones de células T aislados a partir de ratones WT y Msln^{-/-} usaron las mismas cadenas de TCR Vα4 y Vβ9 de la línea germinal, restringiendo cualquier diferencia de secuencia entre los clones de mayor afinidad a partir de las cepas respectivas con respecto a CDR3 (figura 3A).

EJEMPLO 3

25 EVALUACIÓN DE CONSTRUCTOS CSF2R::IL-2R A MODO DE EJEMPLO EN MODELO DE RATÓN

Se evaluaron constructos químicos CSF2R::IL-2R a modo de ejemplo y los impactos de los mismos sobre la función de células T modificadas por ingeniería específica de antígeno en un modelo preclínico de ratón de leucemia diseminada, basándose en ratones transgénicos TCR_{gag} y en eritroleucemia inducida por el virus de Friend en ratones C57BL/6 (FBL).

Se insertaron constructos químicos CSF2R::IL-2R basados en genes murinos (similares a los ilustrados en la figura 2) y/o un constructo que codifica para un receptor de células T dirigido a mesotelina (TCR₁₀₄₅ (específico de MSLN₄₀₆₋₄₁₄)) (Stromnes *et al.*, Cancer Cell 28:638, 2015, TCR₁₀₄₅ (incluyendo la secuencia)) en el vector retroviral pMP71 y se usaron para transducir esplenocitos de ratón P14 Thy1.1⁺ primarios estimulados con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Se generaron constructos de proteínas de fusión mediante PCR. Luego, los constructos se clonaron con TOPO direccionalmente en el vector pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) y se transfirieron al vector retroviral pMP71-attR usando la tecnología Gateway® (Invitrogen). Se transdujo la línea celular de empaquetamiento retroviral Plat-E (Morita *et al.*, 2000, Gene Therapy 7:1063-1066, 2000; Cell Biolabs, Inc.) con el vector retroviral usando el reactivo de transducción Effectene (Qiagen). Se recogió el sobrenadante viral los días 2 y 3 después de la transfección y luego se usó para transducir las células T, que contenían TCR₁₀₄₅ en algunos casos. Un día antes de la transfección, se estimularon células T P14 Thy1.1⁺ con anticuerpo anti-CD3/CD28 y 100 U/ml de rhIL-2. Se realizó la transducción de las células T P14 Thy1.1⁺ en placas de 12 pocillos en presencia de IL-2 y Polybrene mediante infección por centrifugación durante 90 minutos a 1000 g. Las células T transducidas con TCR₁₀₄₅ se reestimularon con esplenocitos Thy1.2⁺ irradiados pulsados con péptido Msln₄₀₆₋₄₁₄ (GQKMNAQAI, 1 µg/ml) e IL-2 humana recombinante (r-IL2, 50 UI/ml) siete días después de la activación de células T con anticuerpo anti-CD3/CD28. El día 5 después de la reestimulación con antígeno, >90 % de las células T expresaron el TCR introducido. Se infundieron 5 × 10⁶ células que expresaban TCR₁₀₄₅ en ratones C57BL/6 (B6) Thy1.2⁺ (Jackson Laboratory) junto con 5 × 10⁸ ufp de una vacuna de adenovirus atenuada recombinante (i.m.) diseñada por ingeniería para expresar mesotelina murina recombinante (Ad-Msln). Las células TCR₁₀₄₅⁺ del donante infundidas incluían una población que expresaba la proteína de fusión GM/IL2R ("GM/IL2R") y una población que no expresaba el constructo ("WT"). Se realizó un seguimiento de las células del donante los días 0, 8, 14 y 21 después de la infusión.

En más detalle, se analizaron las células T TCR₁₀₄₅⁺ del donante (seleccionadas basándose en Thy1.1^{+/+}/Vβ9⁺) mediante citometría de flujo para determinar la expresión en superficie de una molécula que contenía la porción extracelular de un GM-CSFR (con expresión en monocitos usados como control positivo). El día 0, mediante este ensayo se observó que aproximadamente el 50 % de las células T TCR₁₀₄₅⁺ del donante expresaban la molécula química (figura 3B).

Continuó monitorizándose la presencia de células T del donante en la sangre de los animales a lo largo del tiempo. Las células T del donante persistieron y fueron detectables en la sangre durante al menos 21 días después de la transferencia (figura 4A).

Tal como se muestra en las figuras 4B y 4C, las células T del donante que expresaban la proteína de fusión CSF2R::IL-2R (tal como se determina mediante tinción con anticuerpo anti-GM-CSF) ("GM/IL2R") mostraron una

5 ventaja de supervivencia y/o proliferativa, en comparación con las células T del donante que no expresaban la proteína de fusión ("WT"). Por ejemplo, el día 14 después de la transferencia y continuando hasta el día 21, las células que expresaban GM/IL2R representaban prácticamente la totalidad de las células T del donante detectadas en la sangre (figuras 4B y 4C). Estos resultados indican que la proteína de fusión proporcionó una ventaja de persistencia a las células T sometidas a transferencia adoptiva que expresan TCR₁₀₄₅.

10 Estos datos indican que las proteínas de fusión de esta divulgación, en algunas realizaciones, proporcionan a las células T, tales como células T que contienen TCR específicos de antígeno, una ventaja de supervivencia y/o expansión, que es consistente con la utilidad del constructo para mejorar la persistencia de y la exposición a las células transferidas, incluyendo mejorar la eficacia en un microambiente tumoral.

REIVINDICACIONES

1. Célula huésped, que comprende una proteína de fusión y una proteína de unión a antígeno,
 - 5 en la que la proteína de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción de dominio de unión a citocina del mismo y un componente intracelular que comprende una porción intracelular de IL-2R, un dominio de señalización intracelular o una porción de dominio de señalización intracelular del mismo; y
 - 10 en la que la proteína de unión a antígeno es un receptor de células T (TCR), un receptor de antígeno químérico (CAR) o ambos, en la que el TCR es exógeno con respecto a la célula huésped; y
 - 15 en la que la proteína de unión a antígeno es específica de un antígeno específico de cáncer.
- 15 2. Célula huésped según la reivindicación 1, en la que:
 - 20 el componente extracelular comprende una porción extracelular de CSF2R, CSF1R, CSF3R, CXCR2 o CCR8 humanos; o
 - 25 el dominio de unión a citocina de la proteína de fusión se une específicamente a GM-CSF, M-CSF, G-CSF, CXCL1, CXCL2 o CCL1 humanos.
 - 30 3. Célula huésped según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el dominio de unión a citocina comprende un dominio de unión específico de GM-CSF, seleccionado de:
 - 25 una porción extracelular de un CSF2RA que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, o
 - 30 una porción extracelular de un CSF2RB que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.
 - 35 4. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio transmembrana de la proteína de fusión tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 ó 23, o comprende un dominio transmembrana de IL-2RG, IL-2RB, IL-2RA, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, IL-21R, CSF2RA, CSF2RB, CSF1R, CSF3R, CXCR2, CCR8, CD2, CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 ζ , CD25, CD27, CD28, CD40, CD79A, CD79B, CD80, CD86, CD95 (Fas), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD200R, CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD272 (BTLA), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), CD279 (PD-1), CD300, CD357 (GITR), A2aR, DAP10, FcR α , FcR β , FcR γ , Fyn, GAL9, KIR, Lck, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PTCH2, ROR1, ROR2, Ryk, SLP76, SIRP α , pT α , TCR α , TCR β , TIM3, TRIM, LPA5 o Zap70 humanos.
 - 40 5. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula huésped comprende al menos dos proteínas de fusión que:
 - 45 (a) son capaces de asociarse para formar un heteromultímero en la superficie de la célula huésped; y/o
 - 50 (b) comprenden, cada una, un componente extracelular diferente y los componentes extracelulares diferentes son capaces de asociarse entre sí para formar un dominio de unión a citocina funcional; y/o
 - 55 (c) comprenden, cada una, un componente intracelular diferente y los componentes intracelulares diferentes son capaces de asociarse entre sí para formar un dominio de señalización intracelular funcional.
 - 60 6. Célula huésped según la reivindicación 5, en la que al menos uno de los componentes intracelulares diferentes comprende: (a) un dominio de señalización intracelular o una porción de dominio de señalización intracelular del mismo de IL-2R γ , IL-2R β , IL-4RA, IL-7R, IL-15RA o IL-21R, o (b) una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, o una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12.
 - 65 7. Célula huésped según la reivindicación 5 ó 6, en la que:
 - una de las al menos dos proteínas de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción de dominio de unión a citocina del mismo y un componente intracelular que se compone de un dominio de señalización

intracelular funcional o una porción de dominio de señalización intracelular del mismo de IL-2R γ humano o tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; y

- 5 la otra de las al menos dos proteínas de fusión comprende un dominio transmembrana dispuesto entre un componente extracelular que comprende un dominio de unión a citocina o una porción de dominio de unión a citocina del mismo y un componente intracelular que se compone de: (a) un dominio de señalización intracelular o una porción de dominio de señalización intracelular del mismo de IL-2R β humano o tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, y/o (b) un dominio de señalización o una porción de dominio de señalización del mismo de IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R o IL-21R.
8. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en la que el heteromultímero en la superficie de la célula huésped es un heterodímero o heterotímero.
- 10 9. Célula huésped según la reivindicación 8, en la que:
- 15 (A) una de las al menos dos proteínas de fusión:
- 20 (i) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1;
- 25 (ii) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; o
- (iii) consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; y
- 30 (B) la otra de las al menos dos proteínas de fusión:
- (i) tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- 35 (ii) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; o
- (iii) consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
- 35 10. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el TCR exógeno se une a un complejo抗原:HLA a una K_a igual o superior a 10^7 M^{-1} .
- 40 11. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el antígeno específico de cáncer comprende antígeno WT-1, mesotelina, ROR1 o ciclina-A1.
- 45 12. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la expresión de la proteína de fusión en una célula T que comprende un TCR o receptor de antígeno químérico específico del antígeno específico de cáncer da como resultado un aumento de al menos aproximadamente 1,5 veces, 2 veces o 3 veces de la supervivencia, la expansión, la citotoxicidad, la secreción de citocinas y/o la respuesta a múltiples tandas de estimulación, por la célula T, en respuesta a la unión del antígeno y/o tras la administración a un sujeto, y/o da como resultado un aumento de al menos aproximadamente 1,5 veces, 2 veces o 3 veces del tiempo de supervivencia, la supervivencia libre de enfermedad o la mejora de uno o más síntomas de la enfermedad de un sujeto al que se le administra la célula, en comparación con una célula sustancialmente igual que la célula T pero que no contiene la proteína de fusión.
- 50 13. Célula huésped, que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión y la proteína de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 55 14. Composición que comprende la célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador, diluyente o excipiente farmaceúticamente aceptable.
- 60 15. Célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o composición según la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 65 16. Célula huésped o composición para su uso según la reivindicación 15, en la que el cáncer es un tumor seleccionado de:
- un tumor hemático, que opcionalmente es un tumor hemático seleccionado de LLC o LMC, o
- un tumor sólido, que opcionalmente es un tumor sólido seleccionado de un tumor de cáncer de mama,

ES 2 981 274 T3

cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer de páncreas, o que opcionalmente es un tumor sólido seleccionado de un adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células pequeñas, tumor carcinoide atípico o cáncer de mama triple negativo.

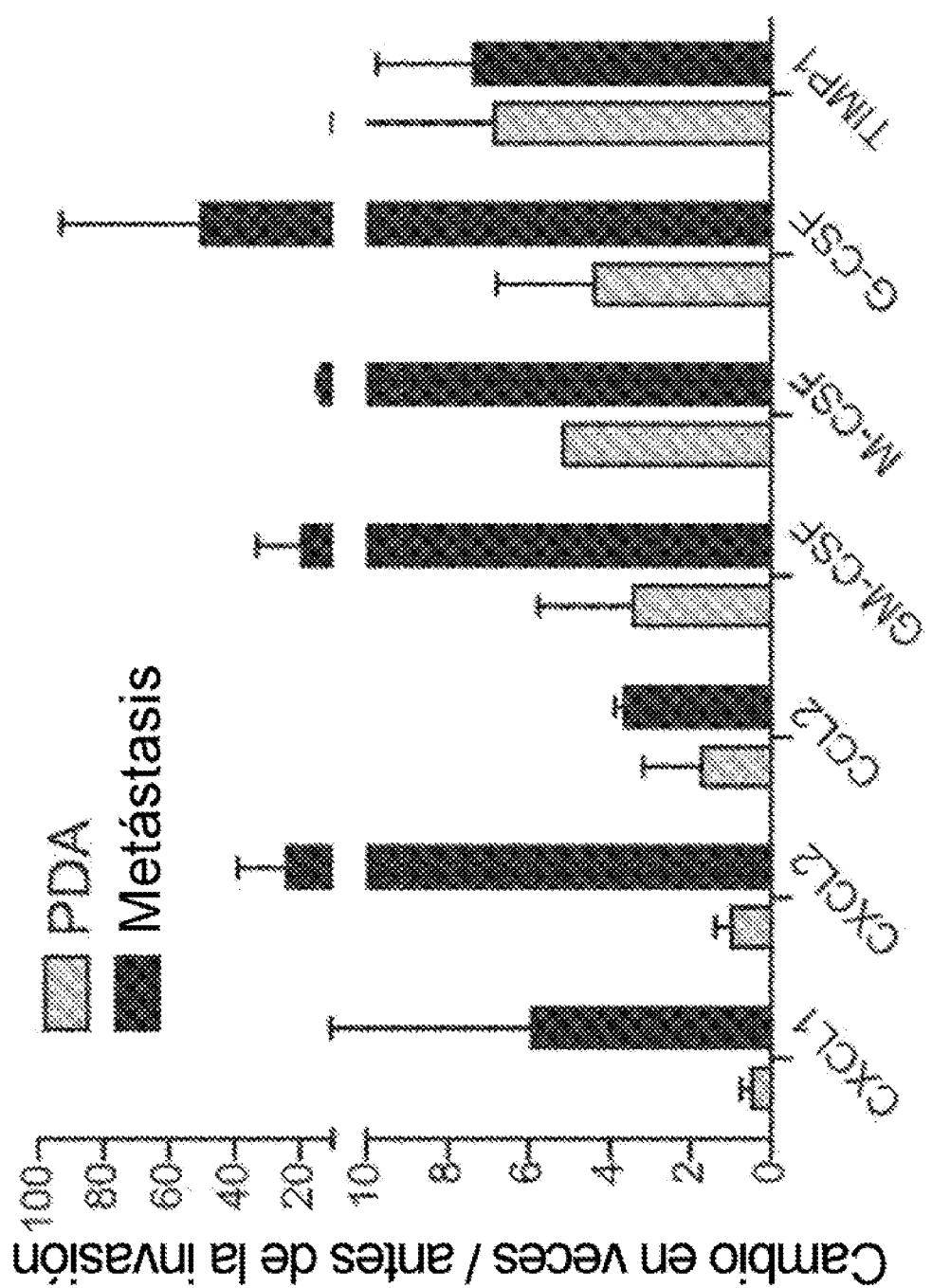


Fig. 1

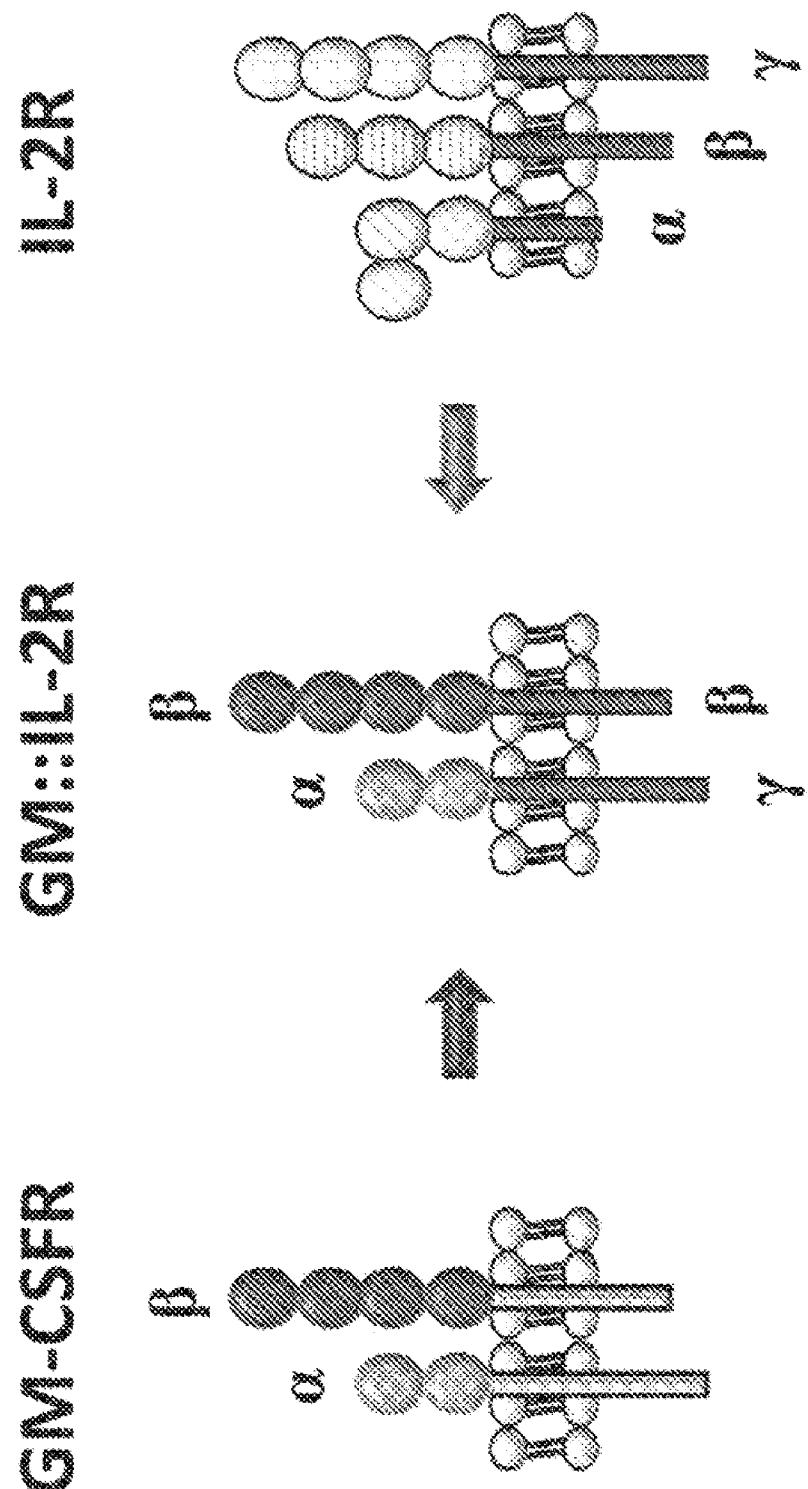
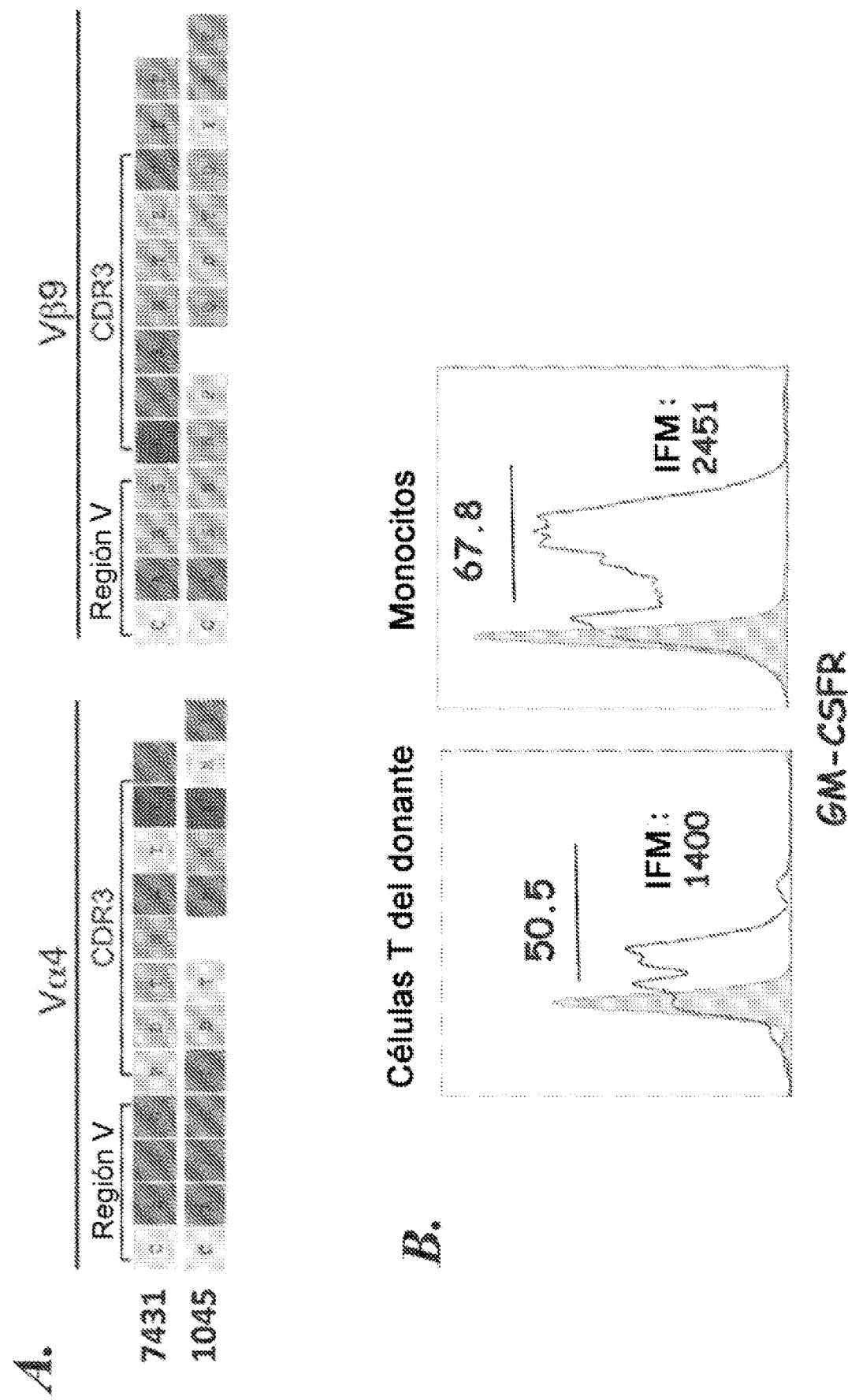


Fig. 2



Figs. 3A y 3B

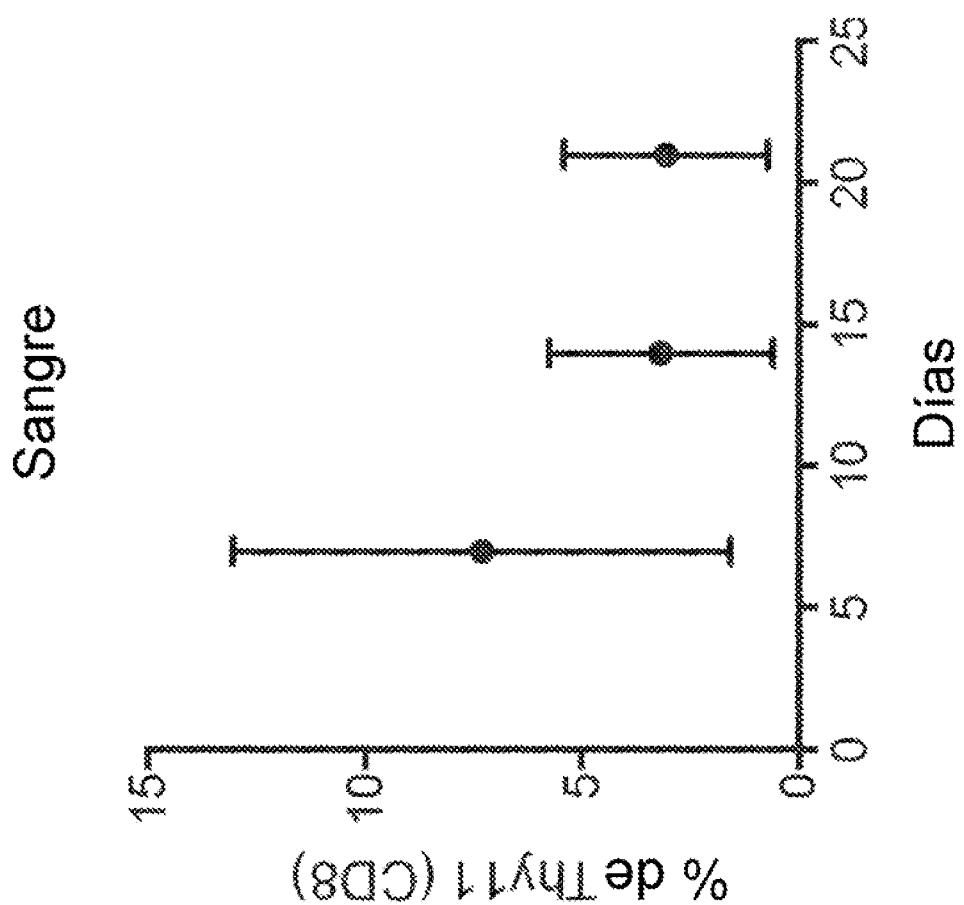


Fig. 4A

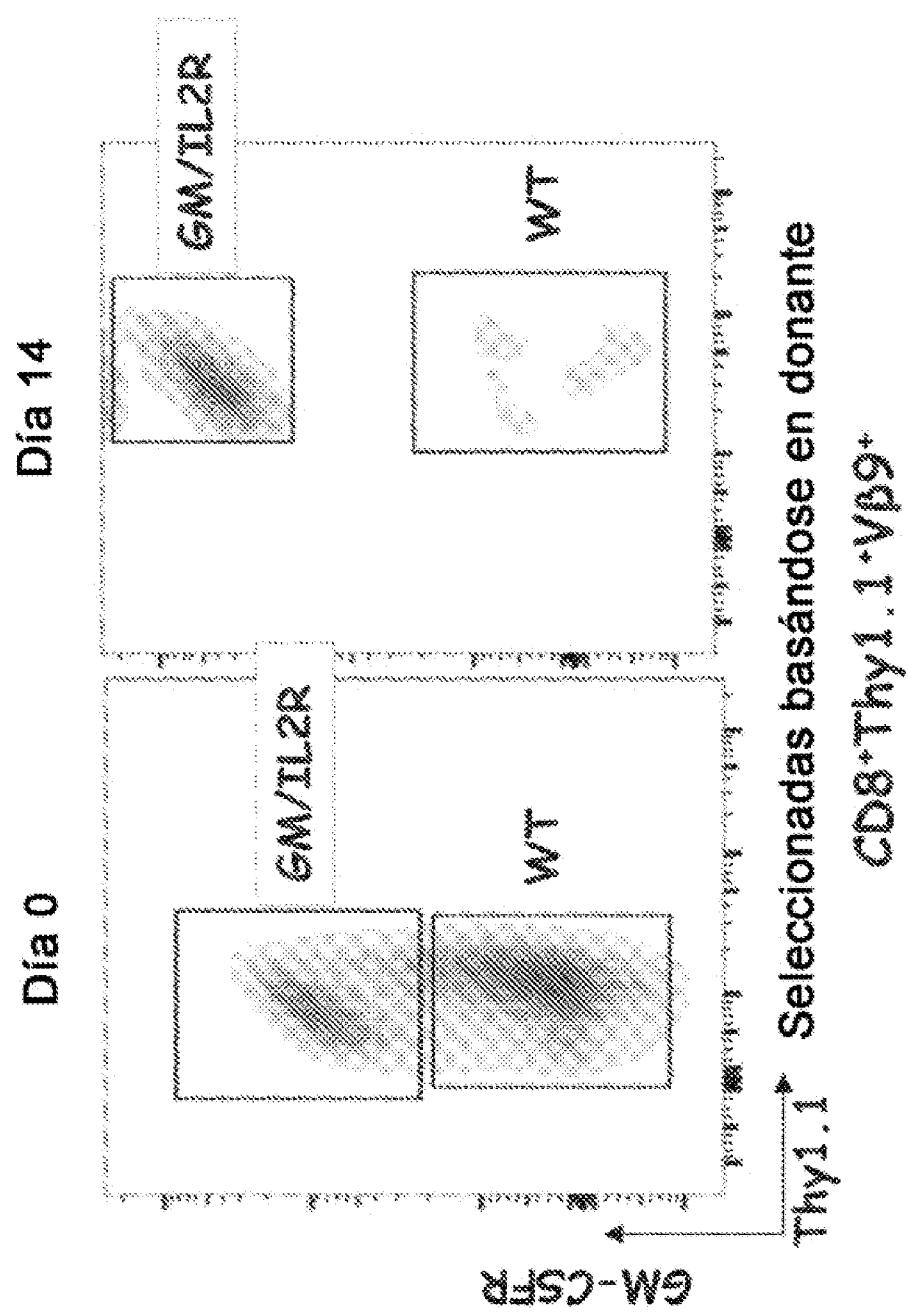


Fig. 4B

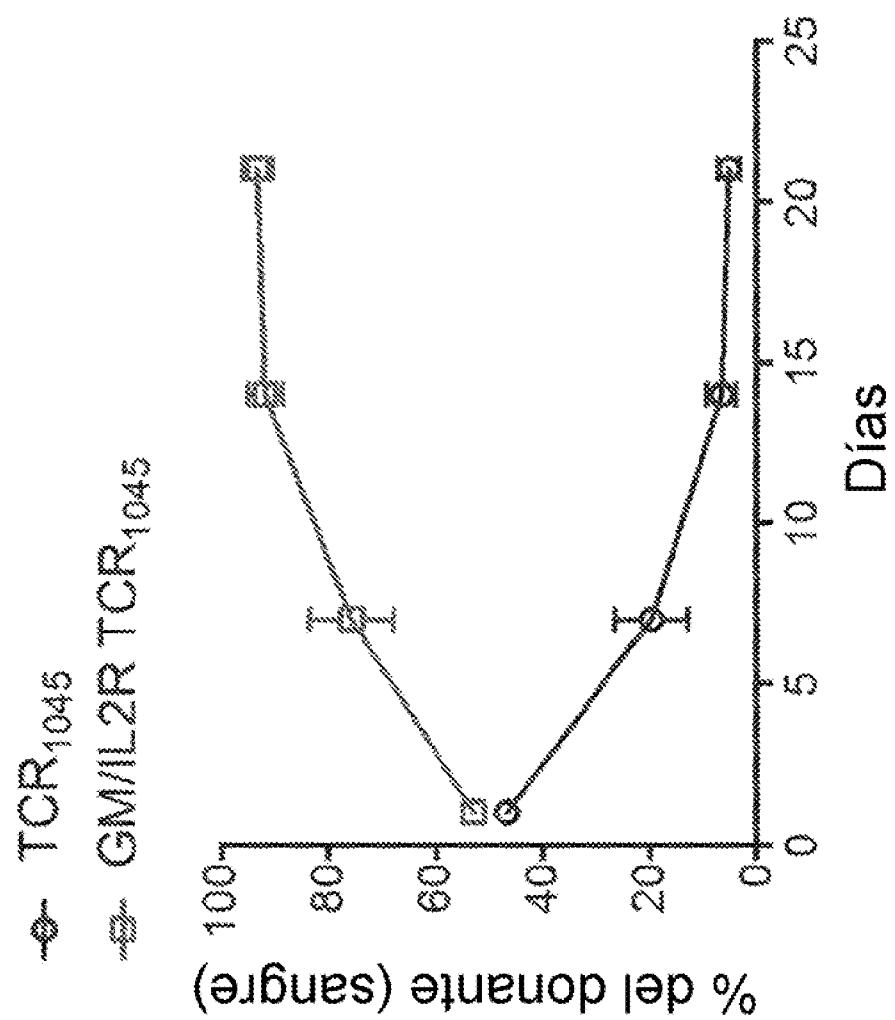


Fig. 4C