

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 782**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2015** **PCT/US2015/065620**
87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO16100232**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2015** **E 15870818 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024** **EP 3240805**

54 Título: **Receptor de antígeno quimérico biespecífico de puerta O sensible a CD19 y CD20**

30 Prioridad:

15.12.2014 US 201462091854 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2025

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.00%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US y
SEATTLE CHILDREN'S HOSPITAL, DBA
SEATTLE CHILDREN'S RESEARCH INSTITUTE
(50.00%)

72 Inventor/es:

CHEN, YVONNE Y.;
ZAH, EUGENIA y
JENSEN, MICHAEL C.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 3 008 782 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

Receptor de antígeno quimérico biespecífico de puerta O sensible a CD19 y CD20

Antecedentes de la invención

Los receptores de antígenos quiméricos (CARs, por sus siglas en inglés) son moléculas artificiales que redirigen la especificidad de los linfocitos T hacia antígenos predeterminados. Esos receptores se utilizan frecuentemente para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal sobre un linfocito T; con la transferencia de su secuencia codificante facilitada por vectores retrovirales o lentivirales. Usando la transferencia adoptiva, los linfocitos T autólogos pueden modificarse genéticamente *ex vivo* para expresar un CAR específico de una célula cancerosa de interés. Los linfocitos T, que pueden reconocer y destruir entonces las células cancerosas, se reintroducen en el paciente. Los estudios clínicos de fase I de este enfoque han mostrado eficacia.

La forma más común de los CARs son fusiones de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) obtenidos a partir de anticuerpos monoclonales, fusionados con el dominio de señalización CD3-zeta, que contiene 3 ITAMs. CD3-zeta puede no proporcionar una señal de activación totalmente competente y se necesita una señalización coestimuladora adicional. Por ejemplo, se pueden usar CD28 y OX40 quiméricos con CD3-zeta para transmitir una señal proliferativa/supervivencia, o los tres se pueden usar juntos. Tales moléculas dan como resultado la transmisión de una señal zeta como respuesta al reconocimiento de su diana por parte del scFv.

Múltiples ensayos clínicos han informado de una eficacia terapéutica notable de los linfocitos T modificados con CAR anti-CD19 contra neoplasias de linfocitos B tanto agudas como crónicas. Sin embargo, también se ha informado de múltiples casos de pacientes que recidivan con la aparición de una leucemia o linfoma CD19 negativo (Maude et al. 2014). Este problema de escape de antígeno, es decir, células tumorales que evaden el tratamiento al perder el antígeno que es la diana del agente terapéutico del linfocito T, se aborda mediante esta invención.

El documento US 2013/0280220 se refiere a CARs que comprenden dos o más dominios de reconocimiento de antígenos no idénticos.

Compendio de la invención

CD20 y CD19 son ambos marcadores de la totalidad de linfocitos B presentes en la gran mayoría de los linfocitos B malignos. Un CAR de puerta O (del inglés, OR-gate) que desencadena la muerte tumoral siempre que esté presente CD20 o CD19, reduce la probabilidad de un escape de antígenos, al requerir que las células tumorales pierdan ambos antígenos para escapar al direccionamiento, un evento que ocurre con una probabilidad significativamente menor que las mutaciones de un solo antígeno. Por lo tanto, esta invención tiene una fuerte ventaja competitiva en comparación con la terapia convencional con células CAR-T anti-CD19 de entrada única.

Se proporciona una estructura artificial de proteína de receptor de antígeno quimérico (CAR) de CD19-O-CD20. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican el CAR CD19-O-CD20. El CAR CD19-O-CD20 de la invención es un CAR biespecífico que puede desencadenar la activación de linfocitos T tras la detección de CD19 o CD20 (o ambos). Es una molécula única que confiere una capacidad de reconocimiento de dos entradas a linfocitos T humanos modificados por ingeniería genética, para expresar de manera estable este CAR. El CAR CD19-O-CD20 comprende lo siguiente (desde el extremo N-terminal al C-terminal): una secuencia señal de SEQ ID NO: 2; un scFv anti CD20 que comprende una región variable de cadena ligera y de cadena pesada codificada por SEQ ID NO: 3; un enlazador (G₄S)₄; un scFv anti-CD19 que comprende una región variable de cadena ligera y de cadena pesada codificada por SEQ ID NO: 4; un dominio espaciador de SEQ ID NO: 5; un dominio transmembranaral de CD28 de SEQ ID NO: 6; un dominio de señalización coestimulador citoplasmático de 4-1BB de SEQ ID NO: 8; un dominio de señalización zeta de CD3 de SEQ ID NO: 9.

En una realización, la estructura artificial también comprende el péptido de salto ribosómico T2A, que se puede utilizar para enlazar el CAR con una proteína o péptido de interés, como por ejemplo, un marcador de epítipo. En algunas realizaciones, se incluye un marcador clasificable, por ejemplo, un receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt) o proteínas fluorescentes, que se pueden usar para separar linfocitos T que expresan el CAR.

En algunas realizaciones, la estructura artificial del CAR se empaqueta en un vector lentiviral, que incluye, sin limitación, un vector lentiviral de tercera generación. Los linfocitos T humanos primarios pueden transducirse lentiviralmente para integrar y expresar de manera estable el CAR de puerta O. Las células que expresan el CAR pueden enriquecerse mediante una clasificación celular activada por fluorescencia o magnetismo y expandirse mediante una estimulación antigénica o estimulación con anticuerpos de CD3/CD28 o microperlas recubiertas de anticuerpos.

En algunas realizaciones de la invención, se proporciona un vector de expresión que codifica el CAR CD19-O-CD20, en donde el vector puede ser un vector lentiviral, un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector viral adenoasociado, un plásmido o ARN.

En algunas realizaciones, una dosis eficaz de una célula terapéutica de la invención, que incluye una célula efectora, tal como un linfocito T, una célula NK, una célula NKT, etc., para uso en un método para tratar a un individuo con cáncer. El individuo puede tener una neoplasia maligna de linfocitos B, que expresa uno o ambos CD20 y CD19. Cualquier método puede comprender además la etapa de administrar al individuo una terapia adicional contra el cáncer, tal como cirugía, radiación, terapia hormonal, quimioterapia, inmunoterapia o una combinación de las mismas, por ejemplo.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente invención, se hace referencia ahora a las siguientes descripciones tomadas en conjunto con el dibujo acompañante.

Figura 1. Esquema de CAR biespecífico, CD19-O-CD20. El CAR biespecífico está compuesto por (desde el extremo N-terminal al C-terminal): una secuencia señal que dirige la localización de CAR hacia la membrana celular, el scFv de CD20, un enlazador peptídico (por ejemplo, (G4S)1, (G4S)3, SEQ ID NO:1 (EAAAK)1 o SEQ ID NO:1 (EAAAK)3), el scFv de CD19, seguido de un espaciador (por ejemplo, el dominio bisagra de IgG4), un dominio transmembranal (por ejemplo, el dominio transmembranal de CD28), uno o más dominios coestimuladores (por ejemplo, el dominio citoplasmático de 4-1BB o CD28) y el dominio citoplasmático de la cadena ζ de CD3. Para facilitar la identificación de los linfocitos T que expresan CAR mediante una tinción de anticuerpos, el receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt) se puede enlazar con el CAR a través de un péptido autoescindible (por ejemplo, T2A).

Figuras 2A-2B. Los CARs de puerta O pero no los CARs de CD19 de entrada única responden a las células de linfoma Raji que han experimentado un escape de antígeno. (A) Expresión en la superficie de CD69, CD137 y CD107a (en intensidad media fluorescente; MFI por sus siglas en inglés) por células CAR-T después de una coincubación de 24 horas con células Raji CD19-. (B) Producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2 por las células CAR-T en (A) tal y como se mide mediante un ensayo citométrico con matriz de perlas. Simulado: linfocitos T que se han transducido de forma simulada y no expresan CARs. CD19 Corto: CAR de CD19 de entrada única con bisagra de IgG4 como espaciador. CD20 Largo: CAR de CD20 de entrada única con bisagra de CH2-CH3 de IgG4 como espaciador. (G4S)1, (G4S)4, SEQ ID NO:1 (EAAAK)1 y SEQ ID NO:1 (EAAAK)3 indican la secuencia enlazadora de los CARs CD19-O-CD20, todos los cuales contienen la bisagra de IgG4 como espaciador. Los valores notificados son la media de triplicados, indicando las barras de error una desviación estándar. Los valores de P se calcularon mediante la prueba t de Student de dos colas; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Figura 3. Lisis celular mediante células CAR-T de entrada única y puerta O después de 4 horas de coincubación con células de tipo silvestre (WT; CD19+/CD20+) o Raji CD19- (CD19-/CD20+). Los valores notificados son la media de triplicados, indicando las barras de error la desviación estándar. Las identidades de los CARs son como se describen en la Figura 2.

Figuras 4A-4B. La biespecificidad no compromete la detección de CD19 por los CARs de puerta O. Las células CAR-T se coincubaron con Raji de tipo silvestre o dianas K562 CD19+ durante 24 horas. (A) La expresión en la superficie de CD69, CD137 y CD107a se cuantificó mediante citometría de flujo. (B) La producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2 se cuantificó mediante un ensayo con matriz de perlas citométricas. Los valores notificados son la media de triplicados, indicando las barras de error una desviación estándar. Las identidades de los CARs son como se describen en la Figura 2.

Figuras 5A-5E. Los CARs de puerta O anulan los efectos del escape de antígenos *in vivo*. (A) Progresión tumoral en ratones NSG que portan xenoinjertos de Raji de tipo silvestre (WT) o mixtos (75% de tipo silvestre; 25% de CD19-). La formación de imágenes por bioluminiscencia se realizó los días 6, 18 y 21 después de la inyección del tumor (los linfocitos T se inyectaron el día 7). (B) Supervivencia de los ratones que portan xenoinjertos tumorales de Raji WT o mixtos y que han sido tratados con linfocitos T que no expresan CAR o el CAR CD19 de entrada única. Los resultados indican que el CAR CD19 de entrada única es capaz de extender significativamente la supervivencia de los animales a los que se han injertado tumores de Raji WT. (C) Supervivencia de los ratones que portan xenoinjertos tumorales de Raji WT y que han sido tratados con linfocitos T que expresan los CARs de CD19 de entrada única o de puerta O. Los resultados indican que los CARs de puerta O son tan eficaces como el CAR de CD19 de entrada única, para dirigirse al linfoma de Raji de tipo silvestre. (D) Supervivencia de ratones que portan xenoinjertos de tumores de Raji mixtos y que han sido tratados con linfocitos T que no expresan CAR, que expresan el CAR de CD19 de entrada única o de puerta O. Los resultados indican que solo los CARs de puerta O son capaces de extender significativamente la supervivencia de los animales que portan tumores mutantes CD19-. (E) Supervivencia de los ratones que portan xenoinjertos tumorales de Raji WT o mixtos y que han sido tratados con linfocitos T que expresan los CARs de puerta O. Los resultados indican que los CARs de puerta O son igualmente eficaces contra tumores de Raji WT y mutantes CD19-, haciendo así que los linfocitos T se vuelvan insensibles a la pérdida de antígeno en las células diana. N = 5 en todos los grupos de ensayo. Los valores de P se calcularon mediante análisis de prueba de rango logarítmico; n.s.: no significativo ($p > 0,1$); *: $p < 0,1$; **: $p < 0,05$. Las identidades de los CARs son como se describen en la Figura 2.

Figura 6. Mapa plasmídico representativo de un CAR biespecífico, CD19-O-CD20.

Descripción detallada de las realizaciones

De acuerdo con la convención establecida desde hace tiempo en la legislación de patentes, las palabras "un" y "una", cuando se usan en la presente memoria descriptiva junto con la expresión que comprende, incluyendo las reivindicaciones, indican "uno, una o más". Algunas realizaciones de la invención pueden consistir en o consistir esencialmente en uno o más elementos, etapas de método y/o métodos de la invención. Se contempla que cualquier método o composición descritos en el presente documento se puede implementar con respecto a cualquier otro método o composición descritos en el presente documento, cuyas realizaciones se describen, y aún obtener un resultado similar o equivalente sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.

La expresión "modificación genética" significa cualquier procedimiento que añade, deleta, altera o interrumpe una secuencia de nucleótidos endógena e incluye, pero no se limita a, una transferencia génica mediada por virus, una transferencia mediada por liposomas, una transformación, una transfección y una transducción, por ejemplo, transferencia génica mediada por virus, tal como el uso de vectores basados en virus de ADN como lentivirus, adenovirus, retrovirus, virus adenoasociados y virus del herpes.

"Variante" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierto grado de un polipéptido de secuencia natural. Normalmente, las variantes de secuencias de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente, al menos aproximadamente un 90% de homología por secuencia. Las variantes de secuencias de aminoácidos pueden poseer sustituciones, delecciones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de referencia.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc, tales como células citolíticas naturales, neutrófilos y macrófagos, reconocen un anticuerpo unido en una célula diana y causan la lisis de la célula diana. La actividad ADCC puede evaluarse usando métodos, tales como los descritos en el documento de patente de EE. UU. núm. 5.821.337.

"Células efectoras" son leucocitos que expresan uno o más receptores de la región constante y realizan funciones efectoras.

"Tratar" una enfermedad o un trastorno, tal como cáncer, significa tomar medidas terapéuticas o medidas preventivas para mitigar o disminuir la enfermedad o el trastorno. Ese tratamiento incluye la prevención, el alivio de síntomas, la disminución o la estabilización del alcance y/o la remisión.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto o una molécula que es eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno.

"Cáncer" se refiere a células que experimentan un crecimiento celular incontrolado. Los ejemplos de cáncer incluyen cáncer colorrectal y cáncer de cabeza y cuello. Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer.

Una "citocina" es una proteína liberada por una célula para actuar sobre otra célula como mediador intercelular.

"No inmunogénico" se refiere a un material que no inicia, provoca o potencia una respuesta inmune, en donde la respuesta inmune incluye las respuestas inmunes adaptativas y/o innatas.

El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en producir una cadena polipeptídica; incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante "líder y cola", así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). Se pueden desarrollar algunos genes que carecen, en su totalidad o en parte, de intrones. Algunas secuencias líder pueden potenciar la traducción del ácido nucleico en polipéptidos.

El término "aislado" significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Tales polinucleótidos podrían formar parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían formar parte de una composición, y aún pueden aislarse porque ese vector o composición no forma parte de su entorno natural.

Tal y como se usa en el presente documento, un "vector" puede ser cualquier agente capaz de suministrar o conservar un ácido nucleico en una célula hospedadora, e incluye vectores virales (por ejemplo, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales o vectores virales adenoasociados), plásmidos, ácidos nucleicos desnudos, ácidos nucleicos que forman un complejo con un polipéptido u otras moléculas y ácidos nucleicos inmovilizados sobre partículas de fase sólida. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en uno o varios sitios apropiados de endonucleasas de restricción, mediante procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos y otros se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica. La transcripción de un ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención a través de eucariotas superiores se incrementa insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores

son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación en 100 a 270, un potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

5 "Receptor" significa un polipéptido que es capaz de unirse específicamente a una molécula. Mientras que muchos receptores pueden funcionar típicamente sobre la superficie de una célula, algunos receptores pueden unirse a ligandos cuando se localizan dentro de la célula (y antes del transporte a la superficie) o pueden residir predominantemente de forma intracelular y unirse allí a un ligando.

10 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multispecíficos y fragmentos de anticuerpos que pueden ser humanos, de ratón, humanizados, quiméricos o derivados de otra especie. Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos que está siendo dirigido hacia un sitio antigénico específico.

15 "Anticuerpo o fragmento funcional del mismo" significa una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con un antígeno o epítipo particular, e incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. El término anticuerpo incluye formas de inmunoglobulinas modificadas genéticamente o modificadas de otro modo, tales como intracuerpos, peptidocuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos). La expresión fragmento de anticuerpo funcional incluye fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno, incluyendo, por ejemplo, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG y scFv. El término scFv se refiere a un anticuerpo Fv monocatenario en donde los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo tradicional bicatenario se han unido para formar una cadena.

20 Es de particular interés el uso de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv). Los scFvs son moléculas recombinantes en las que las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulina ligeras y pesadas que codifican dominios de unión a antígeno, se modifican por ingeniería genética para proporcionar un único polipéptido. Generalmente, las secuencias de V_H y V_L están unidas por una secuencia enlazadora. Véase, por ejemplo, Ahmad (2012) Clinical and Developmental Immunology Article ID 980250, que se incorpora específicamente en esta memoria como referencia.

25 La longitud del enlazador de ADN usado para unir ambos dominios es importante para un plegamiento apropiado. Se ha estimado que el enlazador peptídico debe abarcar 3,5 nm (35 Å) entre el extremo carboxi-terminal del dominio variable y el extremo amino-terminal del otro dominio, sin afectar a la capacidad de los dominios para plegarse y formar un sitio de unión a antígeno intacto. Muchos de tales enlazadores son conocidos en la técnica, por ejemplo, enlazadores flexibles que comprenden tramos de residuos de Gly y Ser.

30 Espaciador. Una región espaciadora une el dominio de unión al antígeno con el dominio transmembranaral. Debe ser lo suficientemente flexible para permitir que el dominio de unión al antígeno se oriente en diferentes direcciones para facilitar el reconocimiento del antígeno. La forma más sencilla es la región bisagra de una inmunoglobulina, por ejemplo, la bisagra de una cualquiera entre IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, particularmente las secuencias de proteínas humanas. Las alternativas incluyen la región CH₂CH₃ de una inmunoglobulina y porciones de CD3. Para muchas estructuras artificiales basadas en scFv, una bisagra de IgG es eficaz.

35 Péptido T2A. El péptido T2A puede usarse para unir el CAR de la invención a un marcador epitópico u otra proteína o péptido, incluyendo sin limitación un marcador clasificable. Los vectores multicistronicos unidos a T2A pueden usarse para expresar múltiples proteínas a partir de un único marco de lectura abierto. Las secuencias peptídicas pequeñas de T2A, cuando se clonan entre genes, permiten una producción estequiométrica eficaz de productos proteicos discretos dentro de un único vector a través de un nuevo evento de "escisión" dentro de la secuencia peptídica de T2A. Se conocen y se usan en la técnica diversas secuencias peptídicas de 2A, por ejemplo, véase Szymczak-Workman et al. (2012) Cold Spring Harb Protoc. 2012(2):199-204, incorporado en este documento específicamente como referencia. Son pequeños (18-22 aminoácidos) y tienen secuencias amino terminales divergentes, lo que minimiza la posibilidad de una recombinación homóloga y permite usar múltiples secuencias peptídicas de 2A diferentes dentro de un único vector.

40 Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "microentorno tumoral" se refiere a cualquiera y a todos los elementos del medio tumoral que crean un entorno estructural y o funcional para que el proceso maligno sobreviva y/o se expanda y/o se extienda.

45 CD20 es una proteína de la superficie celular presente en la mayoría de los neoplasmas de linfocitos B, y ausente en neoplasmas de linfocitos T de apariencia similar. Las células positivas para CD20 también se encuentran a veces en casos de enfermedad de Hodgkin, mieloma y timoma. CD20 es la diana de los anticuerpos monoclonales (mAb, por sus siglas en inglés) rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, genmab, obinutuzumab, lbrutumomab tiuxetán, AME-133v, IMM-106, TRU-015 y tositumomab, que son todos agentes activos en el tratamiento de todos los linfomas y leucemias de linfocitos B. Para los fines de la presente invención, cualquiera de esos anticuerpos se puede convertir en un scFv y usar en el CAR. En algunas realizaciones, el scFv se obtiene a partir del anticuerpo monoclonal Leu16.

Los cánceres que pueden tratarse con reactivos anti-CD20, por ejemplo, anticuerpos y CARs, incluyen sin limitación linfomas y leucemias de linfocitos B, por ejemplo, linfomas no Hodgkin de linfocitos B (LNH), por ejemplo, linfoma folicular; leucemia de células pilosas y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC). Los reactivos anti-CD20 también son útiles en el tratamiento del melanoma, por ejemplo, dirigidos a las células madre del cáncer de melanoma.

La expresión de CD19 es un sello distintivo de los linfocitos B. El antígeno CD19 es una glicoproteína transmembranal de tipo I que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas Ig. CD19 se expresa específicamente en linfocitos B normales y en linfocitos B neoplásicos. Se considera un marcador de la totalidad de linfocitos B, expresado a lo largo del desarrollo de los linfocitos B pero con expresión tres veces mayor en células maduras que en comparación con los linfocitos B inmaduros. Sin embargo, la expresión de CD19 se pierde en las células plasmáticas diferenciadas terminalmente. Durante la linfopoyesis, CD19 dirige el destino de los linfocitos B y la diferenciación modulando la señalización del receptor de linfocitos B. Está implicada de manera decisiva en el establecimiento de una respuesta inmune óptima a través de sus funciones en el desarrollo independiente de antígenos, así como en la activación inducida por inmunoglobulinas de los linfocitos B. La carencia de CD19 en seres humanos y ratones conduce a una respuesta humoral global deteriorada, con una mayor susceptibilidad a la infección.

El patrón de expresión de CD19 se conserva entre las neoplasias malignas de linfocitos B en donde se expresa en subtipos indolentes y agresivos de linfomas y leucemias de linfocitos B, incluyendo LNH, LLC de linfocitos B y leucemia linfoblástica aguda (LLA) no T. CD19 se expresa en el linaje de linfocitos B en una etapa anterior, en comparación con CD20. Este hecho, por lo tanto, puede proporcionar una ventaja a los fármacos dirigidos hacia CD19 sobre rituximab, especialmente para neoplasias tempranas de linfocitos B como la leucemia linfoblástica aguda. Además, se muestra que CD19 se internaliza eficazmente en modelos tumorales de linfoma con el uso de diferentes anticuerpos monoclonales (huB4, hBU12). Se pueden formatear diversos anticuerpos anti-CD19 para uso en las estructuras artificiales de la presente invención, incluyendo sin limitación huB4, que es un anticuerpo anti-CD19 humanizado. En algunas realizaciones de la invención, el scFv anti-CD19 es el anticuerpo FMC63.

Las terapias con linfocitos T dirigidos, altamente selectivas están surgiendo como modalidades no tóxicas eficaces para el tratamiento del cáncer. Las neoplasias malignas son enfermedades complejas en donde múltiples elementos contribuyen a la patogénesis global a través de mecanismos tanto distintos como redundantes. Por lo tanto, dirigir simultáneamente diferentes marcadores específicos del cáncer podría dar como resultado una mejor eficacia terapéutica. Sin embargo, el desarrollo de dos productos celulares distintos para uso clínico como terapia de combinación no es práctico, debido a obstáculos reguladores y costes. Por el contrario, convertir un linfocito T en biespecífico compensa el escape tumoral debido a la pérdida de antígeno.

En una realización, el CAR biespecífico comprende una molécula de la superficie celular endógena modificada que puede usarse como un epítipo de selección no inmunogénico compatible con una selección inmunomagnética. Los epítopos no inmunogénicos son aquellos que normalmente no provocan una respuesta inmune en seres humanos, y en general son proteínas expresadas generalmente en seres humanos, o fragmentos de las mismas. Ese epítipo de selección no inmunogénico puede facilitar una inmunoterapia en pacientes con cáncer, sin un rechazo inmunológico no deseable de los productos celulares. La molécula de la superficie celular endógena puede modificarse o truncarse para retener un epítipo extracelular reconocido por un anticuerpo conocido o un fragmento funcional del mismo, y para eliminar cualquier dominio de señalización o circulación y/o cualquier dominio extracelular no reconocido por dicho anticuerpo conocido. Una molécula de la superficie celular endógena modificada que carece de un dominio de señalización o circulación y/o de cualquier dominio extracelular no reconocido por dicho anticuerpo conocido, se vuelve inerte. En algunas realizaciones, se usa un EGFR truncado para este propósito.

La molécula endógena modificada de la superficie celular puede ser, pero no se limita a, cualquier receptor no inmunogénico relacionado con la superficie celular, glicoproteína, molécula de adhesión celular, antígeno, integrina o grupo de diferenciación (CD) que se modifica tal y como se describe en el presente documento. La modificación de tales moléculas de la superficie celular se logra conservando un epítipo que es reconocido por un anticuerpo conocido o un fragmento funcional del mismo; y eliminando cualquier dominio de señalización o circulación y/o cualquier dominio extracelular no reconocido por un anticuerpo conocido. La eliminación de los dominios de señalización o circulación y/o cualquier dominio extracelular reconocido por un anticuerpo conocido, hace que la molécula de la superficie celular endógena no sea inmunogénica y/o sea inerte.

Por tanto, las realizaciones de la invención utilizan un CAR de puerta O como molécula artificial que permite que las células inmunes (linfocitos T) reconozcan y ataquen específica y claramente dos moléculas diana cancerosas simultáneamente, o que ataquen una célula cancerosa que ha perdido la expresión de CD19 o de CD20. El CAR es una molécula artificial que puede injertarse en linfocitos T usando tecnología de ingeniería genética para hacerlos específicos para una diana de interés. Esa capacidad tiene implicaciones terapéuticas sustanciales, ya que se ha informado de escape a partir de CARs de actividad única.

La estructura de un CAR puede ser cualquier estructura adecuada, como se conoce en la técnica. En el CAR de la invención, se emplea un dominio de señalización citoplasmático obtenido a partir de la cadena ζ del receptor de linfocitos T como al menos parte del receptor quimérico, con el fin de producir señales estimuladoras para la proliferación de linfocitos T y la función efectora después del acoplamiento del receptor quimérico con el antígeno diana. Además, se emplea un dominio coestimulador de 4-1BB para potenciar la activación, la proliferación y la citotoxicidad de los

linfocitos T producidos por el CAR después del acoplamiento con un antígeno. El CAR puede ser un CAR de segunda generación o de tercera generación, en el que la señalización se proporciona a través de CD3 ζ junto con una coestimulación proporcionada por CD28 y 4-1BB.

Las realizaciones de la invención incluyen células que expresan un CAR de puerta O de la invención. La célula puede ser de cualquier tipo, incluyendo una célula inmune capaz de expresar el CAR de puerta O de la invención para una terapia contra el cáncer o una célula, tal como una célula bacteriana, que alberga un vector de expresión que codifica el CAR de puerta O de la invención. Tal y como se usa en el presente documento, los términos y expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" pueden usarse indistintamente. Todos estos términos también incluyen su progenie, que es una cualquiera y todas las generaciones posteriores. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. En el contexto de expresar una secuencia de ácido nucleico heterólogo, "célula hospedadora" se refiere a una célula eucariota que es capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede usarse, y se ha usado, como receptora de vectores. Una célula hospedadora puede "transfectarse" o "transformarse", lo que se refiere a un procedimiento mediante el cual se transfiere o se introduce ácido nucleico exógeno en la célula hospedadora. Una célula transformada incluye la célula primaria objeto y su progenie. Tal y como se usa en el presente documento, los términos células "modificadas" y "recombinantes" o células hospedadoras se entiende que se refieren a una célula en la que se ha introducido una secuencia de ácido nucleico exógeno, tal como, por ejemplo, un vector. Por lo tanto, las células recombinantes son distinguibles de las células de origen natural, las cuales no contienen un ácido nucleico introducido de forma recombinante. En realizaciones de la invención, una célula hospedadora es un linfocito T, incluyendo un linfocito T citotóxico (también conocido como TC, célula T citotóxica, CTL, linfocito T-citolítico, célula T citolítica, linfocitos T CD8+ o linfocito T citolítico); las células NK y las células NKT también están incluidas en la invención.

Las células pueden ser células autólogas, células singénicas, células alogénicas e incluso en algunos casos, células xenogénicas. En muchas situaciones se podría desear destruir los CTLs modificados, ya sea para terminar el tratamiento si las células se vuelven neoplásicas, en investigaciones en donde es de interés la ausencia de las células después de su presencia, o en otros eventos. Para este fin, se puede proporcionar la expresión de ciertos productos génicos que permitan destruir las células modificadas en condiciones controladas, tales como genes suicidas inducibles.

A modo de ilustración, los pacientes con cáncer o pacientes susceptibles de padecer un cáncer o sospechosos de tener cáncer pueden tratarse del modo siguiente. Los cánceres incluyen particularmente leucemias y linfomas de linfocitos B. Los CTLs modificados tal y como se describe en el presente documento, pueden administrarse al paciente y se conservan durante periodos de tiempo prolongados. El individuo puede recibir una o más administraciones de las células. En algunos casos, las células modificadas genéticamente están encapsuladas para inhibir el reconocimiento inmunitario y estar colocadas en el sitio del tumor. Las células pueden inyectarse en el sitio del tumor o inyectarse por vía intravenosa, por ejemplo.

En casos particulares, se proporcionan al individuo CTLs terapéuticos, modificados para comprender un CAR de puerta O de la invención. Las células pueden administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes a los de otro tipo de terapia contra el cáncer. Las células pueden administrarse en la misma formulación o en formulaciones diferentes a las de otro tipo de terapia contra el cáncer. Las células pueden administrarse al individuo por vías de administración separadas como otro tipo de terapia contra el cáncer. Las células se pueden administrar mediante inyección en un sitio tumoral o por vía intravenosa u oral, por ejemplo. Las vías de administración rutinarias para tales composiciones son conocidas en la técnica.

Los vectores de expresión que codifican el CAR de puerta O de la invención pueden introducirse como una o más moléculas de ADN o estructuras artificiales, en donde puede haber al menos un marcador que permitirá la selección de las células hospedadoras que contienen la o las estructuras artificiales. Las estructuras artificiales pueden prepararse de manera convencional, en donde los genes y las regiones reguladoras se pueden aislar, según sea apropiado, ligar, clonar en un hospedador de clonación apropiado, analizar mediante restricción o secuenciación u otros medios convenientes. Particularmente, usando la PCR, pueden aislarse fragmentos individuales que incluyen la totalidad o partes de una unidad funcional, en donde pueden introducirse una o más mutaciones usando una "reparación de cebador", ligación, mutagénesis *in vitro*, etc., según sea apropiado. La o las estructuras artificiales una vez completadas y cuando se ha demostrado que tienen las secuencias apropiadas, se pueden introducir entonces en los CTLs a través de cualquier medio conveniente. Las estructuras artificiales pueden integrarse y empaquetarse en genomas virales defectuosos, no replicantes, como adenovirus, virus adenoasociados (VAA) o virus del herpes simple (VHS) u otros, incluyendo vectores retrovirales o vectores lentivirales, para una infección o transducción dentro de las células. Las estructuras artificiales pueden incluir secuencias virales para una transfección, si se desea. Alternativamente, la estructura artificial puede introducirse mediante fusión, electroporación, biolística, transfección, lipofección o similares. Las células hospedadoras pueden cultivarse y expandirse en cultivo antes de la introducción de la o las estructuras artificiales, seguido del tratamiento apropiado para la introducción de la o las estructuras artificiales y la integración de la o las estructuras artificiales. Las células se expanden y se criban a continuación en virtud de un marcador presente en la estructura artificial. Varios marcadores que pueden usarse con éxito incluyen hprt, resistencia a neomicina, cinasa de timidina, resistencia a higromicina, etc.

- En algunos casos, se puede tener un sitio diana para recombinación homóloga, en donde se desea que una estructura artificial se integre en un locus particular. Por ejemplo, se puede desactivar un gen endógeno y reemplazarlo (en el mismo locus o en otro lugar) con el gen codificado por la estructura artificial, usando materiales y métodos conocidos en la técnica para la recombinación homóloga. Para la recombinación homóloga, se pueden usar vectores omega o vectores O. Los vectores que contienen elementos útiles tales como orígenes de replicación bacterianos o de levaduras, marcadores seleccionables y/o amplificables, elementos promotores/potenciadores para la expresión en procariontes o eucariontes, etc., que pueden usarse para preparar reservas de ADN de estructuras artificiales y para llevar a cabo transfecciones, son bien conocidos en la técnica, y muchos están disponibles comercialmente.
- Los CTLs que se han modificado con la o las estructuras artificiales se cultivan después en un cultivo en condiciones selectivas y las células que se seleccionan por tener la estructura artificial, pueden expandirse después y se analizan adicionalmente, usando, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa para determinar la presencia de la estructura artificial en las células hospedadoras. Una vez que se han identificado las células hospedadoras modificadas, pueden usarse entonces tal como se había planificado, por ejemplo, expandirlas en cultivo o introducir las en un organismo hospedador.
- Dependiendo de la naturaleza de las células, las células pueden introducirse en un organismo hospedador, por ejemplo, un mamífero, incluyendo seres humanos, de una amplia variedad de maneras. Las células pueden introducirse en el sitio del tumor, en realizaciones específicas, aunque en casos alternativos las células se dirigen al cáncer o se modifican para que se dirijan al cáncer. El número de células que se emplean dependerá de una variedad de circunstancias, la finalidad de la introducción, la vida útil de las células, el protocolo que se va a usar, por ejemplo, el número de administraciones, la capacidad de las células para multiplicarse, la estabilidad de la estructura artificial recombinante y similares. Las células pueden aplicarse como una dispersión, generalmente se inyectan en o cerca del sitio de interés. Las células pueden estar en un medio fisiológicamente aceptable.
- Las células pueden administrarse según se desee. Dependiendo de la respuesta deseada, la manera de administración, la vida de las células, el número de células presentes, se pueden emplear varios protocolos. El número de administraciones dependerá de los factores descritos anteriormente, al menos en parte.
- En algunos casos, se usan vectores de VAA, retrovirales o lentivirales para administrar el CAR de puerta O de la invención a un linfocito T.
- Un virus adenoasociado (VAA) es un sistema de vector atractivo para uso en las células de la presente invención, ya que tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar células que no están en división, haciéndolo así útil para la administración de genes en células de mamífero, por ejemplo, en un cultivo tisular o *in vivo*. El VAA tiene una amplia gama de hospedadores para la infectividad. Los detalles relativos a la generación y el uso de vectores VAA se describen en los documentos de patente de EE. UU. núm. 5.139.941 y 4.797.368.
- Los retrovirus son útiles como vectores de administración debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma del hospedador, transfiriendo una gran cantidad de material genético ajeno, infectando un amplio espectro de especies y tipos celulares y estar empaquetados en líneas celulares especiales.
- Los lentivirus son retrovirus complejos, que, además de los genes retrovirales comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores lentivirales son bien conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de inmunodeficiencia humana: VIH-1, VIH-2 y el virus de inmunodeficiencia de simio: VIS. Los vectores lentivirales recombinantes son capaces de infectar células que no se dividen y se pueden usar para la transferencia génica y expresión de secuencias de ácido nucleico tanto *in vivo* como *ex vivo*. En algunos casos, el vector lentiviral es un vector de tercera generación (véase, por ejemplo, Dull et al. (1998) J Virol. 72(11):8463-71). Tales vectores están disponibles comercialmente. Los plásmidos lentivirales de 2ª generación utilizan el promotor LTR viral para la expresión génica, mientras que los vectores de transferencia de 3ª generación utilizan un promotor LTR híbrido, véase, por ejemplo, Addgene para vectores adecuados.
- Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, una o más células para uso en terapia celular y/o los reactivos para generar una o más células para uso en terapia celular que alberga vectores de expresión recombinantes, pueden estar comprendidos en un kit. Los componentes del kit se proporcionan en un medio de recipiente adecuado. Algunos componentes de los kits se pueden envasar en medio acuoso o en forma liofilizada. El medio de recipiente de los kits generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otros medios de recipiente, en donde se puede colocar un componente, y preferiblemente, en forma de parte alícuota de modo adecuado. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, un tercer u otro recipiente adicional dentro del cual los componentes adicionales pueden colocarse por separado. Sin embargo, en un vial pueden estar comprendidas diversas combinaciones de componentes. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener los componentes en un confinamiento cerrado para la venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o por soplado dentro de los cuales se conservan los viales deseados.

Los métodos para aspectos clínicos pueden combinarse con otros agentes eficaces en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, tales como agentes anticancerígenos. Un agente "anticancerígeno" es capaz de afectar negativamente al cáncer en un sujeto, por ejemplo, destruyendo las células cancerosas, induciendo la apoptosis en las células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de las células cancerosas, reduciendo la incidencia o el número de metástasis, reduciendo el tamaño del tumor, inhibiendo el crecimiento tumoral, reduciendo el suministro de sangre a un tumor o a las células cancerosas, promoviendo una respuesta inmune contra las células cancerosas o un tumor, previniendo o inhibiendo la progresión de un cáncer o aumentando el tiempo de vida de un sujeto con cáncer. Más generalmente, esas otras composiciones se proporcionarán en una cantidad combinada, eficaz para destruir o inhibir la proliferación celular. Ese procedimiento puede implicar poner en contacto las células cancerosas con la estructura artificial de expresión y el o los agentes o factores múltiples al mismo tiempo. Esto puede conseguirse poniendo en contacto la célula con una única composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en donde una composición incluye la estructura artificial de expresión y la otra incluye el o los segundos agentes.

Las terapias contra el cáncer también incluyen una variedad de terapias de combinación con tratamientos tanto químicos como basados en radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, por ejemplo, abraxano, altretamina, docetaxel, herceptina, metotrexato, novantrona, zoladex, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión a receptores de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la transferasa de farnesil-proteína, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier variante análoga o derivada de los anteriores y también combinaciones de los mismos.

Experimental

CAR CD19-O-CD20 biespecífico

Se construyó un CAR biespecífico para tener, desde el extremo N-terminal al C-terminal, una secuencia señal que dirige la localización de CAR a la membrana celular, el scFv de CD20, un enlazador peptídico, el scFv de CD19, seguido de un espaciador (por ejemplo, el dominio bisagra de IgG4), un dominio transmembranal (por ejemplo, el dominio transmembranal de CD28), ninguno o uno o más dominios coestimuladores (por ejemplo, el dominio citoplasmático de 4-1BB o CD28) y el dominio citoplasmático de la cadena ζ de CD3. Para facilitar la identificación de los linfocitos T que expresan CAR mediante tinción de anticuerpos, el receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt) puede unirse al CAR a través de un péptido autoescindible (por ejemplo, T2A).

La secuencia de aminoácidos de diversos componentes es la siguiente:

Secuencia señal de GMpCSF, (SEQ ID NO: 2) METDTLLLVLLLLWVPGSTG

scFv de CD20 (SEQ ID NO: 3)

DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWYATSNLASG
VPAFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKGSTSGG
GSGGGSGGGSSSEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVKQTP
GQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCA
RSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS

scFv de CD19 (SEQ ID NO 4)

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSG
VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSG
KPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVCTVSGVSLPDYGVSWRQPPRKG
LEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYY
GGSYAMDYWGQGTSTVTVSS

Bisagra de IgG4 (SEQ ID NO: 5) ESKYGPPCPPCP

Dominio transmembranal de CD28 (SEQ ID NO: 6)

MFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV

Dominio citoplasmático de CD28 (SEQ ID NO: 7)

RSKRSGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

Dominio citoplasmático de 4-1BB (SEQ ID NO: 8)

KRGRKKLL YI FKQPPM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

Dominio citoplasmático de CD3ζ (SEQ ID NO: 9)

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
PPR

5 Péptido autoescindible de T2A (SEQ ID NO: 10) LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR

CH2 de IgG4 (SEQ ID NO: 11)

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK

CH3 de IgG4 (SEQ ID NO: 12)

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGK

10 Receptor del factor de crecimiento epidérmico truncado (EGFRt) (SEQ ID NO: 13)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHIL
PVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRK
QHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKI
ISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEG
EPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVM
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPPTNGPKIPSIATGMVGALL
LLLVVALGIGLFM

15 Los CARs de puerta O pero no los CARs de CD19 de entrada única responden a células de linfoma Raji que han experimentado un escape de antígeno, como se muestra en la Figura 2, por la expresión de CD69, CD137 y CD1-7a en la superficie de los linfocitos T que expresan CAR, y por la liberación de citocinas. Los controles incluyen un CAR de CD19 corto de entrada única con bisagra de IgG4 como espaciador; y un CAR de CD20 largo de entrada única con bisagra CH2-CH3 de IgG4 como espaciador. Se sometieron a ensayo varios enlazadores, incluyendo (G4S)1, (G4S)4, (SEQ ID NO:1, EAAAK)1, y (SEQ ID NO:1, EAAAK)3.

20 En la Figura 3 se muestra una comparación de la lisis celular mediante células CAR-T de entrada única y puerta O después de una coincubación de 4 horas con células de tipo silvestre (WT; CD19+/CD20+) o Raji CD19- (CD19-/CD20+). La biespecificidad no se vio comprometida en los CARs de puerta O. Las células CAR-T se coincubaron con dianas Raji WT o K562 CD19+ durante 24 horas, y la expresión de los antígenos inducidos por activación relevantes y la liberación de citocinas se muestran en la Figura 4.

25 Los datos *in vivo*, mostrados en la Figura 5, muestran que los CARs de puerta O anulan los efectos de un escape de antígenos. Por la supervivencia de ratones que portaban xenoinjertos tumorales Raji WT o mixtos y se habían tratado con linfocitos T que no expresaban CAR o que expresaban CAR CD19 de entrada única, los resultados mostraban que CAR CD19 de entrada única podía prolongar significativamente la supervivencia de los animales a los que se habían injertado tumores Raji WT, y que los CARs de puerta O son tan eficaces como el CAR CD19 de entrada única para dirigirse al linfoma Raji WT. Sin embargo, solo los CARs de puerta O eran capaces de alargar significativamente la supervivencia de los animales que portaban tumores mutantes CD19-. Los CARs de puerta O son igualmente efica-
30 ces contra tumores Raji WT como los mutantes CD19-, haciendo así que los linfocitos T fueran insensibles a la pérdida de antígeno en las células diana.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de receptor de antígeno quimérico (CAR) CD19-O-CD20, que comprende: una secuencia señal de SEQ ID NO: 2; un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti CD20 que comprende una región variable de cadena ligera y de cadena pesada codificada por SEQ ID NO: 3; un enlazador (G₄S)₄; un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-CD19 que comprende una región variable de cadena ligera y de cadena pesada codificada por SEQ ID NO: 4; un dominio espaciador de SEQ ID NO: 5; un dominio transmembranal de CD28 de SEQ ID NO: 6; un dominio de señalización citoplásmica de 4-1BB de SEQ ID NO: 8; un dominio de señalización zeta de CD3 de SEQ ID NO: 9.
2. El CAR CD19-O-CD20 según la reivindicación 1, en donde el CAR comprende además un marcador clasificable.
3. El CAR CD19-O-CD20 según la reivindicación 2, en donde el marcador clasificable es EGFR truncado.
4. El CAR CD19-O-CD20 según la reivindicación 2, en donde el marcador clasificable es una proteína fluorescente.
5. Un ácido nucleico que codifica un CAR CD19-O-CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. El ácido nucleico según la reivindicación 5, empaquetado en un vector viral.
7. El ácido nucleico según la reivindicación 6, en donde el vector viral es un vector lentiviral.
8. Una célula que comprende una proteína o una estructura artificial de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. La célula según la reivindicación 8, en donde la célula es un linfocito T.
10. Una dosis eficaz de una célula según la reivindicación 9, para uso en un método para tratar el cáncer en un individuo, en particular en donde el cáncer es una neoplasia maligna de linfocitos B.
11. La dosis eficaz de una célula para uso según la reivindicación 10, en donde el individuo es un ser humano.

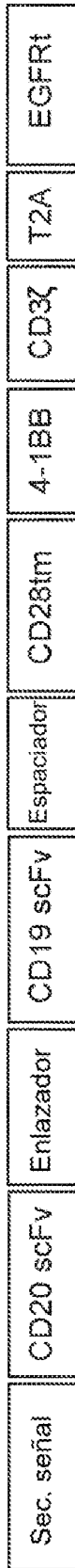


FIG. 1

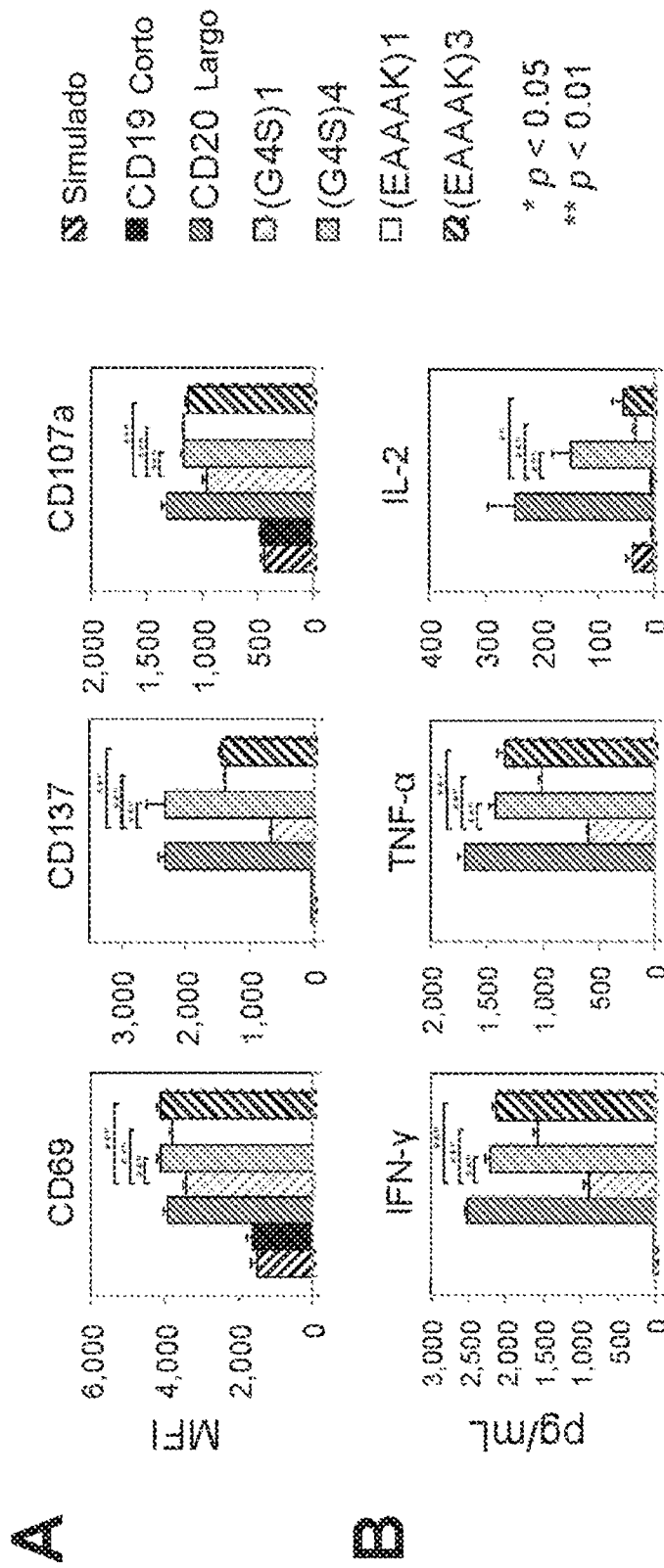


FIGURA 2

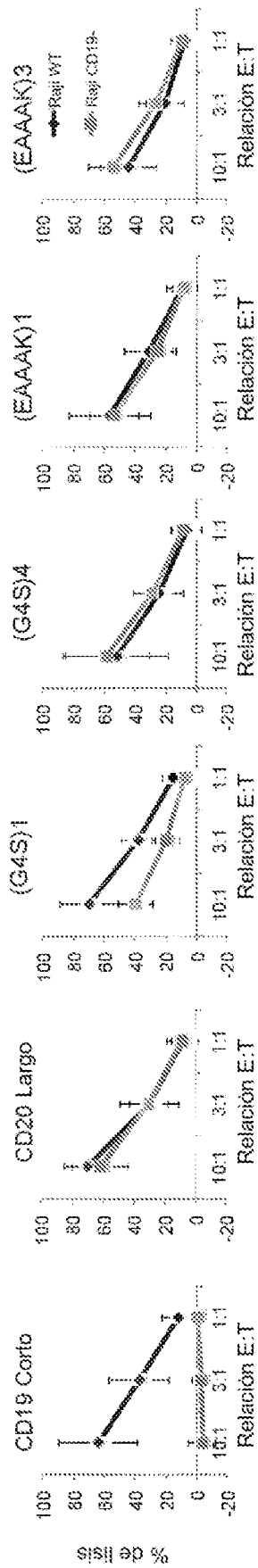


FIGURA 3

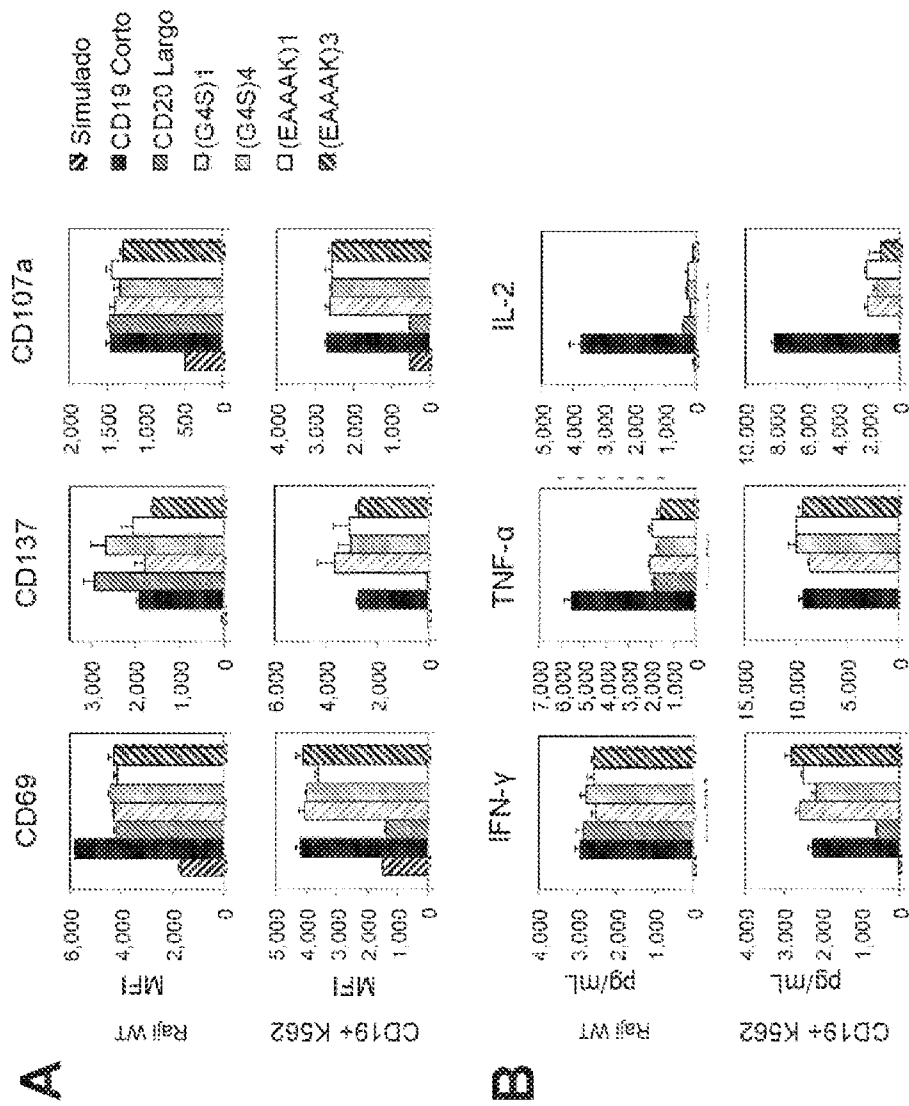


FIGURA 4

FIGURA 5

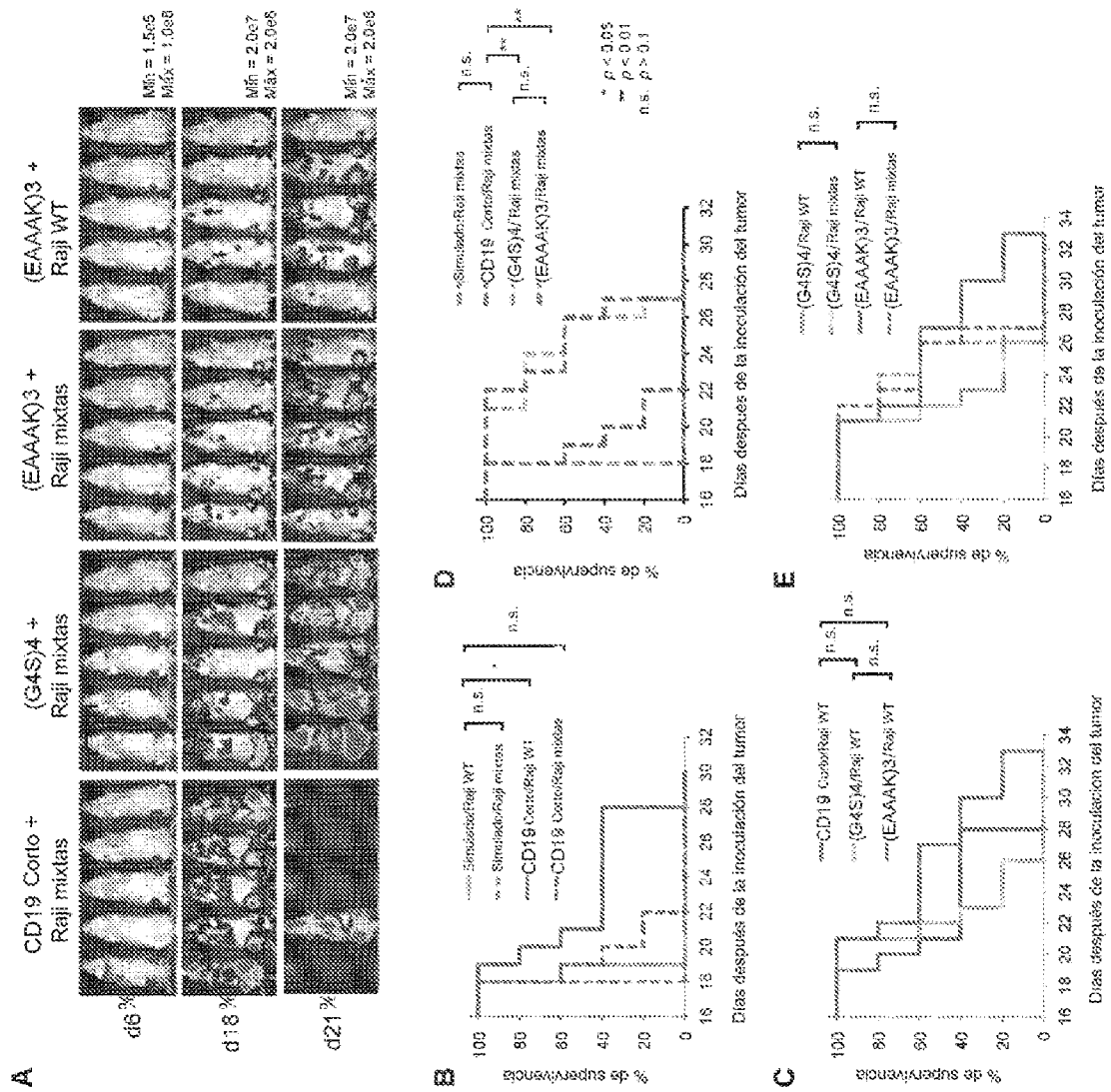


FIGURA 6

